Neue Blutmischpipette sowie Kritik über die Methode der Blut- mischung behufs Vornahme der Blut- körperchenzählung.

Von

Dr. **W. Roerdansz** in Charlottenburg.

(Mit 1 Textfigur.)

Nachdem im Jahre 1852 Vierordt¹⁾ darauf aufmerksam gemacht hatte, die Blutkörperchen in einer bestimmten Quantität Blut zu zählen, verfertigte nach Angaben der beiden französischen Forscher Malassez und Hayem²⁾ im Jahre 1872 der Fabrikant Potain als erster eine kalibrierte, mit drei Marken versehene Blutmischpipette, den „melangeur de Potain“. Schon 1875 verwarfen dann Hayem und Nachet³⁾ die mit einem Mischraum versehene Blutmischpipette und benutzten zwei genau graduierte Pipetten, deren eine zum Abmessen des Blutes, die andere zum Bestimmen des Volumens der Verdünnungsflüssigkeit diene. Diese Methode behielt auch Gower's⁴⁾ bei, während Malassez nach wie vor auch bei seinen späteren Arbeiten die Mischpipette bevorzugte. Im Jahre 1878 verbesserte die Firma Carl Zeiss in Jena den melangeur de Potain nach Angaben von Thoma⁵⁾ dadurch, dass sie die Pipette behufs besserer

1) Abbé, Über Blutkörperchenzählung. Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Med. u. Naturw. in Jena Jahrg. 1878 Nr. 29. — C. Schmidt, Über Vierordt's Methode der Blutanalyse. Zeitschr. f. ration. Med. N. F. Bd. 2 H. 3 S. 293. 1852.

2) Malassez, De la numération des globules rouges du sang ... Compt. rend. t. 75 p. 1528. 1872. — Malassez, Nouvelle méthode de numération des globules rouges et des globules blancs du sang. Arch. de phys. 1874 p. 32.

3) Hayem et Nachet, Sur un nouveau procédé pour compter les globules du sang. Compt. rend. t. 80 no. 16. 1875.

4) Gowers, On the numération of blood-corpuscles. The Lancet vol. 2 p. 797. 1877.

5) Lyon und Thoma, Über die Methode der Blutkörperchenzählung. Virchow's Arch. Bd. 84 S. 131. 1881.

Pflüger's Archiv für Physiologie. Bd. 145.

Reinigung oberhalb des Mischraumes mit einem weiten Ansaugrohr versah und sich bemühte, besser justierte Instrumente auf den Markt

zu bringen. Bürker¹⁾ endlich kehrte 1911 zur Hayem'schen Blutmischungsmethode zurück, indem er zunächst in eine 4975 cmm fassende Pipette Verdünnungsflüssigkeit und in eine zweite Kapillarpipette 25 cmm Blut einsog, dann den Inhalt beider Pipetten durch wiederholtes Ausblasen und Abstreichen der an der Spitze noch haftenden Tröpfchen in ein Mischkölbchen brachte und dort mischte. Aus diesem Mischkölbchen übertrug Bürker vermittels Übertragungspipetten, wie er die kleinen der Form nach einem Augentropfglas ähnlichen Pipetten nennt, das gemischte Blut auf die Zählkammer.

Eine von den bisher gebräuchlichen Formen der Mischpipette wesentliche Abweichung und Verbesserung zeigt eine Blutmischpipette, welche neuerdings von der Firma E. Fleischhauer in Gehlberg in Thüringen nach meinen Angaben angefertigt wird.

Die wesentlichsten Merkmale der neuen Form sind folgende:

1. Über der obersten Marke liegt ein besonderer Mischraum (s. Fig.), der das oder die Mischkügelchen enthält, und auf einer Seite zu einer Standfläche abgeflacht ist.
2. An den Mischraum ist ein Ansaugrohr seitlich angebracht. Dieses Rohr mündet kapillar in den Mischraum und ist ebenso wie die Ansaugspitze der Pipette an seinem oberen Ende mit einer luftdicht aufgeschliffenen Glaskappe versehen.
3. Bei den Marken 0,5, 1,0 und 100 (resp. 10), welche in zylindrischen Kapillarröhren liegen, befinden sich, nach oben und unten hin verlaufend, Hilfsteilungen.

Die Gebrauchsweise der Fleischhauer'schen Blutmischpipette.

Die Pipette, welche der Fabrikant sowohl als Einzelgerät als auch zusammen mit der Zählkammer und auf Wunsch amtlich beglaubigt

1) Bürker, Über weitere Verbesserungen der Methode zur Zählung roter Blutkörperchen. Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol. des Menschen Bd. 142 H. 7/8 S. 337. 1911.

liefert, muss staubfrei gehalten werden, und ist darauf zu achten, dass die inneren Räume des Gerätes stets trocken und fettfrei sind. Die Pipette dient sowohl zur Blutentnahme und Mischung sowie zur Aufbewahrung des gemischten Blutes und definitiven Übertragung der Blutmischung auf die Zählkammer.

Um die Pipette zur Aufnahme des Blutes und der physiologischen Kochsalzlösung bereitzuhalten, werden die Verschlusskappen abgenommen und ein passender Gummischlauch zum Ansaugen der Flüssigkeiten übergestülpt. Wird nun beispielsweise eine Blutverdünnung im Verhältnis von 1:200 gewünscht, so saugt man behutsam bis etwa zur Marke 0,5, reinigt dann sorgfältig die Aussenwände der Spitze von etwa noch anhaftendem Blute und liest nach ungefähr 30 Sekunden die Höhe der eingesogenen Blutsäule an der Marke resp. an deren Hilfsteilung ab. Nunmehr saugt man, die Blutsäule durch die nachströmende Verdünnungsflüssigkeit in die Ampulle vordrängend, die physiologische Kochsalzlösung bis zur Marke 100 ein, trocknet wiederum sauber die Spitze der Pipette ab und liest den Stand der Flüssigkeit an der Marke 100 oder deren Hilfsteilung ab. Zur Mischung der beiden eingesogenen Flüssigkeiten braucht man das Gerät nur leicht um einen Winkel von etwa 120° zu neigen, um ein zusammenhängendes Abfließen in den Mischraum zu bewirken. Sobald der Abfluss beendet ist, genügt ein leichtes Schwenken der Pipette um ihre Längsachse bei hochgerichteter Spitze, um durch die so entstandene Zentrifugalkraft das Mischkügelchen im Mischraum in kreisende Bewegung zu versetzen und somit in wenigen Sekunden eine innige Mischung des Blutes mit der Verdünnungsflüssigkeit zu erzielen.

Bei vorsichtigem abwechselndem Neigen und Heben der Ansaugspitze kann man die nunmehr gemischte Flüssigkeit wieder bis an die Spitze der Pipette beliebige Male vortreiben und zurückfließen lassen. Auf diese Weise wird eine ideale Mischung des Blutes mit der Verdünnungsflüssigkeit erzielt. Auch kann man, namentlich wenn es die Aufbewahrung des gemischten Blutes in der Pipette gilt, an die Ansaugspitze einen Gummischlauch setzen und durch leichten Druck auf den Schlauch die letzten Spuren der Mischung, die eventuell noch an den Wandungen der unterhalb des Mischraumes gelegenen inneren Raumteile haften geblieben sein könnten, in den Mischraum hinüberführen. Soll der Pipette ein kleiner Tropfen gemischten Blutes entnommen werden, so braucht man nur

bevor man wiederum die Flüssigkeit gehörig im Mischraum durchgeschüttelt hat, die Spitze leicht zu neigen, um nunmehr jede beliebige Tropfengrösse auf die Zählkammer fliessen zu lassen. Behufs Aufbewahrung des gemischten Blutes in dem Gerät setzt man wieder auf das Ansaugrohr und auf die Spitze der Pipette die Kappen auf und kann nun das Gerät mit dem Ansaugrohr nach oben zeigend in wagerechter Lage beiseitestellen.

Welche Bedeutung ist den sich im Blute und der Verdünnungsflüssigkeit abspielenden physikalischen und physiologischen Vorgängen bezüglich der Beurteilung einer einwandfreien Blutmischungsmethode in der Blutmischpipette beizumessen?

Voraussetzen wollen wir, dass die ja so häufig beschriebene Art des kleinen operativen Eingriffs in den menschlichen Körper behufs Blutentnahme vorschriftsmässig ausgeführt wird. Wir setzen daher zur Übertragung des Blutes in die Mischpipette letztere mit der Spitze in die Mitte des austretenden Blutropfens und saugen das Blut kapillar bis zu einer beliebigen Marke. Nun müssen wir einige Zeit, etwa 30 Sekunden, warten, bis wir die Ablesung der kapillar eingesaugten Blutsäule an der betreffenden Marke vornehmen können, da es immerhin eines gewissen Zeitraumes bedarf, während dessen das körperwarme Blut Stubentemperatur angenommen hat, sich also um rund 20° C. abgekühlt hat. Würde man die Ablesung gleich machen, so gelangte man zu Scheinresultaten und würde zu wenig Blutkörperchen finden. Nun fragt es sich aber, ob das Blut nicht während dieser kurzen Wartezeit gerinnt. Diese Frage ist zu verneinen, denn die Gerinnung des Blutes tritt bei pathologischem Blute frühestens nach Ablauf von 2,5 Minuten ein¹⁾, während gesundes Blut nach Pratt nach 4 bis 5 Minuten, nach Brodie und Russell²⁾ nach 7,5 bis 8 Minuten und nach Vierordt³⁾ sogar erst nach 9 Minuten gerinnen soll. Ferner hängt nach Bürker⁴⁾ die Gerinnungszeit eng mit der Temperatur zusammen, und zwar derart, dass sie bei + 40° C.

1) Grawitz, Klinische Pathologie des Blutes S. 52. 1906.

2) Brodie and Russell, The Journ. of Physiol. vol. 21 p. 403. 1897.

3) Engel, Leitfaden zur klin. Untersuchung des Blutes S. 33. — Vierordt, Arch. f. Heilk. Bd. 19 S. 193. 1878.

4) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 102 S. 36. 1904, Bd. 118 S. 452. 1907.

2,5 Minuten, dagegen bei $+10^{\circ}\text{C.}$ schon 40 Minuten beträgt¹⁾. Endlich sei noch erwähnt, dass Glätte die Blutgerinnung stundenlang hintanhaltend soll²⁾. Wir können demnach, da wir meistens bei Temperaturen zwischen $17,5^{\circ}$ und $20,0^{\circ}\text{C.}$ arbeiten, andererseits die kapillaren Glaswände der Mischpipette stets einen gewissen Grad von Glätte aufweisen, die kapillar eingesogene Blutsäule erst langsam erkalten lassen, ohne eine Gerinnung derselben befürchten zu müssen.

Nach Abkühlung der Blutsäule wird, wie bereits gesagt, die physiologische Flüssigkeit behufs Verdünnung des Blutes in die Blutmischpipette eingesogen und beide Flüssigkeiten innig miteinander gemischt. Hierbei dürfte uns vornehmlich die Frage interessieren, welche Mischflüssigkeit als die zweckdienlichste anzusehen ist. Ich möchte gleich vorweg erwähnen, dass meines Erachtens das spezifische Gewicht der Flüssigkeit nicht den Ausschlag für die Beurteilung der Brauchbarkeit geben sollte. Man soll sich nie auf eine bestimmte Flüssigkeit mit einem konstanten spezifischen Gewicht festlegen, denn man muss stets berücksichtigen, dass die Schwankungen des spezifischen Gewichtes des Blutes selbst verhältnismässig grosse sind. So ist, ganz abgesehen von dem Einfluss des Geschlechts und des Alters auf die Dichte des Blutes, nach Engel³⁾ bei Polycythämie das spezifische Gewicht des Blutes 1,080; dagegen geht es bei vielen Erkrankungen, wie bei Krebskachexie oder parenchymatöser Nephritis, stark herunter und beträgt bei schweren Anämien nur 1,017. Man achte bei Auswahl der Verdünnungsflüssigkeit vielmehr darauf, dass sie die Blutkörperchen möglichst wenig in ihrer Form verändert und sie nicht aneinanderkleben lässt; ferner soll sie eine gleichmässige Verteilung der Erythrocyten wie der Leukozyten in der Pipette wie in der Zählkammer gestatten und ihre Viskosität endlich derartig beschaffen sein, dass hierdurch das Sedimentieren der Blutkörperchen eine Verzögerung erleidet.

Eine für die Zählung der Erythrocyten geeignete Flüssigkeit ist fraglos die sogenannte Hayem'sche Flüssigkeit von der Dichte 1,015,

1) Nagel, Handbuch der Physiologie des Menschen S. 9. 1910.

2) Freund, Wiener med. Jahrb. S. 259. 1888

3) Engel, Leitfaden zur klin. Untersuchung des Blutes S. 33.

mit welcher ich sehr befriedigende Resultate erhalten habe. Man kann übrigens das spezifische Gewicht dieser Lösung dadurch variieren, dass man den Zusatz von Sublimat prozentual ändert, etwa in der Form, dass man fünf verschiedene Lösungen herstellt, welche, um je 1 % fortschreitend, 1—5 % Sublimat enthalten.

Für die Zählung der Leukocyten eignet sich nach Reinert¹⁾ am besten die kombinierte Methode nach Thoma und Loewit²⁾, also eine 1 %ige Kochsalzlösung, zu welcher $\frac{1}{3}$ % Essigsäure und eine Spur Gentianaviolett hinzugefügt wird.

Nach Eintritt der Hämolyse, die durch die Hayem'sche Flüssigkeit erfolgt, zeigen die Stromata der Erythrocyten als Folge der hypertonischen Wirkung der physiologischen Lösung die bekannte Glockenform. Beim Mischen des Blutes mit der Verdünnungsflüssigkeit werden nun diese Blutkörperchen vermittels des in dem Mischraum rotierenden gläsernen Mischkörpers durcheinander- und aneinander-gewirbelt. Bei dieser Manipulation könnten die Stromata leicht verletzt werden und müssten ihre Trümmer unter dem Mikroskop sichtbar werden. Dem ist glücklicherweise nicht so; vielmehr besitzen diese Körperchen eine hohe Elastizität, und nehmen sie deformierenden Kräften gegenüber leicht ihre ursprüngliche Form wieder an, was experimentell nachgewiesen ist³⁾. Ich habe nur sehr selten bei 320facher Vergrößerung Trümmer von Erythrocyten entdecken können; wenn solche jedoch vorhanden sind, ist keineswegs gleich anzunehmen, dass sie durch Zertrümmerung der Erythrocyten vermittels des Mischkörpers her-rühren. Diese Beschädigungen der Blutkörperchen können ja schon früher, z. B. durch den operativen Eingriff am Körper, stattgefunden haben.

Das sorgfältig gemischte Blut wird dergestalt auf die Objektivplatte der Zählkammern gebracht, dass man durch Neigen der Pipette die gemischte Flüssigkeit, wie bereits erwähnt, den Weg bis zur Spitze der Mischpipette ausführen lässt und von den dort heraus-tretenden Flüssigkeitsmengen einen kleinen Tropfen auf die Objektivplatte in nächster Nähe der mikrometrischen Teilung abstreicht.

1) Reinert, Die Zählung der Blutkörperchen und deren Bedeutung für Diagnose und Therapie. 1891.

2) Loewit, Sitzungsber. d. Kaiserl. Akademie Wien. 1886.

3) Nagel, Handbuch der Physiologie des Menschen S. 29. 1910.

Hier wirft nun Bürker¹⁾ die Frage auf, ob während dieses Vorganges eine Entmischung des Blutes eintreten könnte.

Diese Frage ist, ein exaktes Arbeiten mit der Mischpipette vorausgesetzt, entschieden zu verneinen. Meines Erachtens würde man von einer Entmischung nur dann sprechen können, wenn man reines unverdünntes Blut durch ganz feine Kapillarröhren fließen lassen würde. So zeigte Vierordt²⁾, dass Kapillarröhren, deren inneres Lumen den grössten Durchmesser der Blutkörperchen ($7,5 \mu$) nur um wenig übertrifft, viel mehr Blutflüssigkeit als Blutkörperchen aufnehmen. Auch möchte ich hier noch die diesbezüglichen Versuche von Hirsch und Beck³⁾ zitieren. In einer Mischpipette dagegen, in der das Blut schon etwa im Verhältnis von 1:200 gemischt ist und in der sich eine mehrere Zentimeter hohe Flüssigkeitssäule mit verschiedenen Querschnitten befindet, von denen der kleinste kaum unter 0,3 mm heruntergeht, tritt bei der raschen Entleerung der Pipette die Erscheinung der Entmischung fraglos in den Hintergrund.

Hier wirkt in erster Linie die Schwerkraft und der innere Druck der Flüssigkeit den kapillaren Kräften entgegen. Es findet, da die Blutflüssigkeit beim Sinken in rascher Folge verschiedene Querschnitte passiert, ein permanentes Durchwirbeln der Flüssigkeitsschichten statt, wobei die hochgradig elastischen Stromata der Erythrocyten in der Flüssigkeit hin und her geschleudert werden; sie prallen hierbei auf die Glaswände auf und werden von dort wieder abgestossen, so dass durch diese kontinuierlichen Wirbelbewegungen ein etwaiges schnelleres Ausströmen der axialen Stromfäden gegenüber den peripherischen verhindert wird und die Flüssigkeit in ideal gemischten Zustände an der Pipettenspitze anlangt und austritt. Hierfür spricht auch der Umstand, dass ich bei rund 100 Beobachtungen, die ich bei etwa 80 facher Vergrösserung gemacht habe und bei denen ich mehrere Pipetten von einem mittleren Kapillarröhrendurchmesser von 0,3 mm benutzte, stets ein Bild erhielt, das mir eine gut ausgebildete Verteilung der Erythrocytenstromata zeigte.

Hiermit glaube ich die physikalischen und physiologischen Vorgänge, welche sich während der Blutaufnahme und -mischung sowie

1) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142 H. 7/8 S. 361. 1911.

2) Vierordt, Untersuchungen über die Fehlerquellen bei der Zählung der Blutkörperchen. Arch. f. physiol. Heilk. Bd. 11 H. 5.

3) Hirsch und Beck, Proc. Roy. Soc. t. 78 p. 526. 1907.

während der Entleerung der Blutflüssigkeit innerhalb der Blutmischpipette abspielen, genügend erörtert zu haben, und komme ich jetzt auf die Vorzüge der neuen Form der Fleischhauer'schen Blutmischpipette zu sprechen.

Vorzüge der Fleischhauer'schen Blutmischpipette gegenüber der bisher gebräuchlichen Mischpipettenform.

Eine der wesentlichsten Verbesserungen, die die Fleischhauer'sche Blutmischpipette aufweist, ist die Anbringung eines über den Messräumen liegenden Mischraumes. Durch diese Anordnung ist der gläserne Mischkörper, der Störenfried bei der Justierung der bisherigen Form, endgültig aus den Messräumen ausgeschaltet. Der Fabrikant wird nunmehr in der Lage sein, die Justierung dieser Pipetten mühelos vornehmen zu können, ebenso wie jetzt ein Nachprüfen der messenden Räume in kurzer Zeit vorgenommen werden kann.

Vor 2 Jahren wurden mir mehrere Mischpipetten nach Thoma-Zeiss zur Nachprüfung überwiesen, und stiess ich hierbei insofern auf Schwierigkeiten, als das Quecksilber, das in die messenden Räume eingesogen und dessen Masse hernach durch Wägung bestimmt werden sollte, als nicht benetzendes flüssiges Metall sich nicht glatt an die Wandungen des Mischkörpers anlegte, vielmehr sich zwischen Körper und Quecksilber ein luftgefüllter Raum bildete, welcher bewirkte, dass die ermittelten Resultate rund um 1% vom Mittelwert abwichen. Erst nachdem das Quecksilber in die zuvor evakuierte Mischpipette vorsichtig eingefüllt werden konnte, zeigten die Resultate befriedigende Übereinstimmung. Dieses Prüfungsverfahren ist jedoch ausserordentlich zeitraubend und mühsam, während andererseits die Auswägung des ganzen Raumgehaltes der Mischpipette mittelst Wassers ein Resultat liefern würde, das zu der Genauigkeit des mit Hilfe von Quecksilber ermittelten Resultates des Teilvolumens der Pipette bis zur Marke 0,5 resp. 1,0 sich wie 1:13,5 verhalten würde¹⁾.

Wie zu erwarten war, gestaltete sich dagegen die Prüfung einiger Fleischhauer'scher Blutmischpipetten bedeutend einfacher, und betrug bei Ermittlung der Rauminhalte auf hundertstel Kubikmillimeter die Abweichungen vom Mittelwerte im Maximum nur 0,09%! Es wurde, von der Spitze bis zur obersten Marke gemessen, als Raumgehalt ermittelt für die

	Pipette Nr. 1	Pipette Nr. 2
bei der ersten Wägung . . .	281,31 cmm	296,33 cmm
„ „ zweiten „ . . .	281,01 „	296,72 „
„ „ dritten „ . . .	280,94 „	296,58 „
„ „ vierten „ . . .	280,94 „	— „
<hr/>		
Die grösste Abweichung vom Mittelwert betrug mithin . . .	0,09 %	0,07 %

1) Reinert, Die Zählung der Blutkörperchen. 1891.

Eine weitere Vervollkommnung der neuen Mischpipettenform ist in der Anordnung der Marken zu erblicken. Während bei Anfertigung der Thoma-Zeiss'schen Pipette der Fabrikant darauf Bedacht nehmen musste, die Marken 1 und 10 (resp. 100) so dicht als möglich an die Erweiterung der Kapillaren zu bringen, liegen bei der neuen Form diese Marken in zylindrisch ausgezogenen Kapillarröhren. Bei der früheren Form lag stets die Gefahr nahe, dass die Abmessungen nicht gleichmässig vorgenommen werden konnten, da je nach der Lage der Marke die Meniskusbildungen verschieden ausfallen konnten; denn während der Meniskus der unteren Marke, die sich unmittelbar an den sich zur Ampulle erweiternden Teile der Kapillarröhre befindet, ganz flach erscheint, kann in derselben Pipette der Meniskus der oberen bereits im Kapillarrohre liegenden Marken 100 gut ausgebildet sein. Hierdurch entstehen unbedingt Schätzungsfehler, die mit in die spätere Rechnung eingehen. Liegen bei der Thoma-Pipette die Marken andererseits in den Kapillarröhren zu weit von der Ampulle entfernt, so ist der Mischkörper nicht mehr imstande, den von den Marken 1 und 100 begrenzten Raum innig zu durchmischen. „Die Grenze zwischen verdünntem Blut und reiner Verdünnungsflüssigkeit liegt“, nach Bürker¹⁾, „in diesem Falle nicht, wie es sein soll, an der unterhalb der Ampulle befindlichen obersten Marke 1 der Messkapillare, sondern höher.“ Der Fabrikant solcher Geräte befand sich bezüglich der Anbringung der Abgrenzungsmarken 1 und 10 (resp. 100) nach oben Gesagtem stets in einer Zwangslage, ja ich möchte fast behaupten, dass Unmögliches von ihm verlangt wurde.

Bei der Anfertigung der Fleischhauer'schen Pipette dagegen hat die Entfernung der Marken 1 und 10 (resp. 100) von der Erweiterung kaum eine Bedeutung mehr; nur ist bei den Raumabmessungen auf die Anbringung der Hilfsteilungsmarken Rücksicht zu nehmen. Die neue Pipettenform weist nämlich an den Marken 0,5, 1 und 10 (resp. 100) Hilfsteilungen auf, welche von den Marken nach oben- sowie nach untenhin in der Weise verlaufen, dass sie jeweilig eine kleinste Raumeinheit in zehn gleiche Teile teilen. Ich halte diese Einrichtung für eine grosse Erleichterung im praktischen

1) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142 H. 7 S. 338.

Gebrauch der Pipetten. Wenngleich sich durch Hinterlegung eines Milchglasstreifens an der Pipette die aufsteigende Blutsäule gut und scharf abhebt, so kann es doch vorkommen, dass die Höhe des eingesogenen Blutes nicht genau bis zur Marke 0,5 oder 1 reicht. Diese in der Praxis gar nicht zu vermeidende Unsicherheit des Füllens der Pipette machte sich, wie auch Bürker hervorhebt, bei dem bisher gebräuchlichen melangeur oft unangenehm bemerkbar, namentlich dann, wenn die Blutsäule nicht ganz bis zur Marke heranreichte. Hier schafft die neu angebrachte Hifsteilung sofort Wandel, und ist eine ganz präzise Schätzung bis auf Hundertstel der jeweiligen kleinsten Raumeinheit ermöglicht. Ausserdem wird, da die Menisci der abzulesenden Flüssigkeitssäulen stets in kapillaren Rohrteilen liegen, die Meniskusbildung immer eine gleiche sein, oben wie unten, und können die bei der neuen Pipettenform ermittelten Schätzungswerte der Flüssigkeitsvolumina ohne weitere Bedenken in die Rechnung eingehen.

Um die fertig gemischte Flüssigkeit längere Zeit in der Blutmischpipette aufbewahren zu können, sind die beiden Kommunikationswege zur äusseren Atmosphäre bei der Fleischhauerschen Pipette versperrt, was dadurch erreicht wird, dass das obere Ansaugrohr, wie die Spitze des unteren kapillaren Einsaugrohres, durch luftdicht aufgeschliffene Verschlusskappen abgedichtet ist. Hierdurch wird verhindert, dass die Blutmischung durch Abgabe von Wasserdämpfen an die äussere Atmosphäre konzentrierter wird. Infolgedessen ist es nunmehr möglich, eine Blutmischung längere Zeit einwandfrei in der Mischpipette aufzubewahren und beliebige Zählungen mit ein und derselben stets konstant bleibenden Blutverdünnung zu verschiedenen Zeiten ausführen zu können, eine Tatsache, die sich mit meinen nachfolgend angegebenen Zählresultaten vollkommen deckt. Das Anbringen der Verschlusskappen an den Enden der Pipette ist somit auch als eine wesentliche Verbesserung oder Vervollkommnung der früheren Form des melangeurs anzusprechen, und ist das Fehlen derselben für Bürker¹⁾ auch ein Grund gewesen, die Mischpipette zu verwerfen.

Schliesslich möchte ich noch erwähnen, dass die neue Misch-

1) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142 H. 8 S. 338.

pipette an den beiden Erweiterungen Standflächen erhalten hat, welche es ermöglichen, das Gerät in wagerechter Lage so auf den Experimentiertisch hinzustellen, dass es im Gegensatz zum früheren melangeur unverrückbar in seiner ihm einmal gegebenen Lage verharret.

Nachdem ich die äusserlich sichtbaren Vorzüge der neuen Mischpipette besprochen habe, möchte ich hier noch einige kurze Bemerkungen über den bei diesem Instrument beobachteten Vorgang des Mischens und den der Übertragung der gemischten Flüssigkeiten auf die Zählkammer einflechten.

Die Mischung von Blut und Verdünnungsflüssigkeit vollzieht sich bei richtigem Arbeiten, wie bereits erwähnt, bei der Fleischhauer'schen Pipette ausserordentlich glatt und schnell. Sie beginnt bereits, wie makroskopisch deutlich wahrnehmbar, beim Eintritt beider Flüssigkeiten in die zwischen den Marken 1 und 10 (resp. 100) gelegenen Ampulle. Beim weiteren Mischen im Mischraum ist nur darauf Obacht zu geben, dass die gemischten Flüssigkeiten dabei nicht in das obere Ansaugrohr hinüberfliessen, und dass durch allzu heftiges Schütteln und Rotieren nicht Luftblasen entstehen, die einer darauf folgenden Übertragung der Blutflüssigkeit auf die Zählkammer hinderlich werden könnten. Bei vorschriftsmässigem Mischen, das bei einiger Übung leicht erzielt werden kann, ist ein Auftreten von Luftblasen so gut wie ausgeschlossen, und kann der Austritt einer zusammenhängenden und kontinuierlich ausströmenden Flüssigkeitsmenge behufs Übertragung eines beliebig grossen Tropfens auf die Zählkammer mühelos erreicht werden; nur muss selbstverständlich diese Operation sofort nach vollendeter Mischung unternommen werden.

Wie aus Gesagtem ersichtlich ist, erfolgt die Mischung in der neuen Pipettenform ebenso einfach und dabei zuverlässiger als in dem von Bürker verworfenen melangeur. Zur Erhärtung dieser Behauptung sowie zum Beweise der Tatsache, dass die Blutmischung in der Fleischhauer'schen Mischpipette tagelang gut haltbar ist, will ich einige meiner Zählresultate anführen, welche ich mit Hilfe einer Thoma-Zeiss'schen Zählkammer bei etwa 240facher Vergrösserung erhalten habe.

Erster Versuch.

Es wurden bei drei Zählungen in je 200 Quadraten im Mittel 981 Erythrocyten gezählt. Diese Blutmischung wurde in einer zweiten Pipette auf das Zehnfache verdünnt. Von dieser zweiten Verdünnung ergab eine dreimalige Zählung in je

200 Quadraten im Mittel 91 Erythrocyten. Während ich also nach der ersten Zählung etwa 3,92 Millionen roter Blutkörperchen pro Kubikmillimeter erhielt, ergab die zweite Zählung 3,64 Millionen pro Kubikmillimeter.

Zweiter Versuch.

In einer Mischpipette wurde mit Hilfe Haym'scher Flüssigkeit eine Blutmischung im Verhältnis 1 : 215 hergestellt und dieselbe Mischung an verschiedenen Tagen auf die in ihr vorhandene Anzahl Erythrocyten hin geprüft.

Es wurden gezählt am

ersten Tage in	200 Quadraten	874 Blutkörperchen	= 3,76 Mill. pro Kubikmillim.
zweiten " "	200 " "	839 " "	= 3,61 " " "
" " "	200 " "	886 " "	= 3,84 " " "
dritten " "	200 " "	837 " "	= 3,60 " " "
" " "	200 " "	811 " "	= 3,49 " " "
fünften " "	200 " "	864 " "	= 3,72 " " "
" " "	200 " "	851 " "	= 3,66 " " "

Hiernach beträgt der Mittelwert 3,67 Millionen Erythrocyten pro Kubikmillimeter. Da $\sum v^2 = 805$ ist, ist $f m = \sqrt{\frac{\sum v^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{805}{6}} = 11,6$ Blutkörperchen und $F m = \sqrt{\frac{805}{7 \times 6}} = \sqrt{19,2} = 4,4$; mithin beträgt der mittlere Fehler jeder einzelnen Zählung 3,2 %, während der mittlere Fehler des Mittelwertes 1,2 % ausmacht.

Aus diesen Versuchen geht mit Deutlichkeit hervor, dass eine Entmischung in der Pipette nicht stattgefunden hat, dass ferner die Mischung sich ideal vollzog und eine Verdunstung der in der Pipette eingeschlossenen Flüssigkeit unmöglich ist. Des weiteren können bei dieser Pipette die durch eine bequeme Schätzung ermittelten Werte der eingesogenen Flüssigkeitsvolumina für Blut und Verdünnungsflüssigkeit ohne jedes Bedenken und ohne weitere Zusätze etwa noch erforderlicher Korrektionswerte direkt in die Berechnung eingehen. Die oben errechneten mehr oder weniger grösseren Abweichungen vom Mittelwert sind durch die Unsicherheiten hervorgerufen, die in dem noch unvollkommenen Zählkammer-system zu suchen sind. Hierüber später einmal.

Die Methode der Blutmischung vermittelt Mischkölbchens und getrennter Pipetten.

Nachdem wir die Vorzüge der Fleischhauer'schen Blutmischpipette gegenüber der bisher gebräuchlichen Mischpipettenform kennen gelernt haben, möchten wir zum Schlusse noch die neuer-

dings von Bürker angewandte Methode der Blutmischung sowie der hierzu notwendigen Abmessungsmethoden vermittels Mischkölbchens und getrennter Pipetten kritisch beleuchten.

Bürker¹⁾ braucht zur Ausführung seiner Methode, wie eingangs näher beschrieben, ausser der Zählkammer noch vier Instrumente. Um das Blut sowie die Verdünnungsflüssigkeit von den Pipetten in das Mischkölbchen zu übertragen, bläst Bürker²⁾ nach Aufhören des zusammenhängenden Ablaufes der Pipetten zu wiederholten Malen den Flüssigkeitsrest der Pipetten in das Mischkölbchen aus und tupft die an der Spitze noch austretenden Tröpfchen an der Wandung des Mischkölbchens ab. Das Entleeren der das Blut enthaltenden Pipette in das Mischkölbchen, in welches vorher die Verdünnungsflüssigkeit abpipettiert wurde, geschah sogar in der Weise, dass nach Ablauf des spezifisch schwereren Blutes in die unteren Regionen der im Mischkölbchen befindlichen Mischflüssigkeit die Blutpipette noch mehrmals durch Einsaugen der aus den oberen Schichten des Mischkölbchens stammenden reinen Verdünnungsflüssigkeit gefüllt und wiederholt ausgeblasen wurde. Diese Manipulation des Wiedereinsaugens und Ausblasens wurde so lange wiederholt, „bis“, nach Bürker, „die Pipette möglichst entleert war“. Da nun die Auslaufszeit der Pipetten ziemlich lang bemessen ist — sie soll für die grössere Pipette etwa 40 Sekunden dauern —, so dürften die gesamten Operationen der Blutmischung nach Bürker meiner Meinung nach 5—10 Minuten dauern.

Ich halte diese Art der Entleerung und des Blutmischens für bedenklich, und zwar aus zwei Gründen: erstens weiss man nie, wieviel Prozent des in die Pipette eingesogenen Gesamtvolumens der Flüssigkeit nach dem Ausblasen in dem Instrument zurückbleiben, während andererseits in dem Mischkölbchen eine nicht zu vermeidende Verdunstung eintreten dürfte.

Beide Fehler können sich unter Umständen kompensieren; jedoch ist stets mit ihnen als variabel auftretenden Fehlern zu rechnen. Dieses hebt auch Reinert³⁾ hervor, wenn er schreibt, dass „der Potain'sche Schüttelmischer mit einer bequemen Handlichkeit den

1) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142 H. 8 S. 340.

2) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142 H. 8 S. 347 ff.

3) Reinert, Zählung der Blutkörperchen S. 29. 1891.

Vorzug einer sehr grossen Genauigkeit gegenüber der Anwendung zweier Pipetten verbindet, indem weder Blut noch Serum durch Benetzung der Wände verloren geht, wie dies bei dem anderen Verfahren leicht möglich ist. Auch ist ein Fehler durch Verdunstung von minimalsten Blutmengen so gut wie ganz ausgeschlossen.“

Vierordt und Hayem¹⁾ bestimmten die Menge Serum, die beim Ausblasen zur Benetzung der Wand verbraucht und zurückgehalten wurde, mit der Wage und zogen sie als Konstante in Rechnung. Dadurch kommen sie schon dem wirklichen Resultat näher, aber ein gewisser Fehler haftet den Endergebnissen der Zählresultate immer noch an; es müsste denn sein, dass die in den Pipetten verbleibenden Flüssigkeitsreste bei jeder Zählung durch die Wage erneut bestimmt werden. Ist es doch bekannt, dass die Werte der in Pipetten verbleibenden Flüssigkeitsreste von so vielen Faktoren abhängig sind, dass von einer diesbezüglichen Konstanz nicht mehr die Rede sein kann. So sind sie beispielsweise eine Funktion des Volumens und des spezifischen Gewichts der Flüssigkeit, ferner der inneren Reibung, der Temperatur, des Luftdrucks, der Weite der Auslaufspitze sowie des Drucks des durchgeblasenen Luftstromes.

Nach den Arbeiten von Hermes und Kreitling²⁾ betragen die Mengen der in ausgeblasenen Pipetten verbleibenden Flüssigkeitsreste bei 50 ccm fassenden Pipetten im Mittel 132 cmm = 0,26 % des Gesamtvolumens,

5	"	"	"	"	35	"	= 0,7 %	"	"
1	"	"	"	"	17	"	= 1,7 %	"	"

Nach den von mir angestellten Untersuchungen an Kapillarpipetten erhielt ich für destilliertes Wasser folgende Werte:

D	h	J	Rest	Rest in Prozenten
mm	mm	cmm	mg	des Gesamtvolumens
0,64	45,5	14,40	0,30	2,05
0,76	50,5	22,78	0,17	0,75
0,76	53,5	24,40	0,20	0,84
0,26	55,5	2,99	0,02	0,67

Hierbei bedeutet D den Durchmesser des Kapillarrohres und h die Höhe der eingesogenen Flüssigkeit in Millimetern sowie J das durch Wägung ermittelte Volumen der Füllflüssigkeit in Kubikmillimetern. Man sieht aus diesen Ergebnissen, wie variabel die nach dem Ausblasen in Kapillarpipetten verbleibenden Flüssigkeitsreste sind, und dass hierdurch unbedingt ein gewisser

1) Vierordt, Arch. f. physiol. Heilk. Bd. 11 H. 5.

2) Beobachtungen in der Kaiserl. Normal-Eichungs-Kommission. 1891.

Grad von Unsicherheit in die Methode der Blutkörperchenzählung bei Anwendung zweier Pipetten hineinkommt.

Das soeben Gesagte gilt in gleichem Maasse bezüglich der im Mischkölbchen auftretenden Verdunstung während der Mischung und Übertragung des Blutes. Die Wasserdampfabgabe hängt in erster Linie von der Grösse der verdunstenden Oberfläche und von der Temperatur ab, dann aber auch von dem Feuchtigkeitsgehalt der Luft, vom Barometerstande und vielen anderen Faktoren zweiten Grades.

Nach meinen Beobachtungen, die ich mit einer Flüssigkeitsmenge von 5018 mg — in diesem Falle destilliertem Wasser — in einem kleinen offenen Porzellantiegel von 22,5 mm mittlerem inneren Durchmesser anstellte, betrug die Verdunstung bei 776 mm Barometerstand, einer Arbeitstemperatur, die zwischen 15,6° und 16,7° C. schwankte, und einem mittleren Feuchtigkeitsgehalt der Atmosphäre von 62 % relativer Feuchtigkeit im geschlossenen Wagenkasten bei unbewegter Luft

nach 2 Minuten	=	1,8 mg
" 4 "	=	3,6 "
" 5 "	=	4,4 " .

Berücksichtigt man noch, dass die gesamte Manipulation der Blutübertragung aus den Pipetten in das Mischkölbchen, die Mischung im Kölbchen selbst sowie die Übertragung von dort auf die Zählkammer mittels einer Übertragungspipette einen Zeitraum von ca. 10 Minuten beansprucht, andererseits die Verdunstung noch durch mehrmaliges Einblasen in das Kölbchen sowie durch höhere Aussentemperaturen erheblich vermehrt wird, so ist anzunehmen, dass von 5 g Flüssigkeit mindestens 20—25 mg, d. h. 0,4—0,5 % des ursprünglich im Mischkölbchen vorhanden gewesenen Gesamtvolumens der gemischten Flüssigkeit, verdunstet.

Hiermit dürfte wohl die Beweisführung erbracht sein, dass beim Arbeiten nach der Bürker'schen Methode stets mit dem Auftreten der beiden vorher erwähnten Fehlerquellen, nämlich mit den variablen in den Pipetten verbleibenden Flüssigkeitsresten und mit der Verdunstung grösserer Mengen Wasserdampfes, zu rechnen sein wird.

Ferner macht sich auch bei diesen Pipetten das Fehlen der Hilfsteilungen unangenehm bemerkbar, so dass ein Abschätzen der jeweilig eingesogenen Flüssigkeiten erschwert ist, wenn man die Einstellung des Meniskus nicht genau in der Höhe der Mare vornehmen kann.

Schliesslich möchte ich noch erwähnen, dass es jedem Arzt wohl angenehmer sein dürfte, mit einer Pipette zu arbeiten, als mit vier Instrumenten; denn er würde zum Arbeiten wie zum Reinhalten der Bürker'schen Instrumente viel mehr Zeit brauchen, als dieses bei der neuen Form der Mischpipette der Fall ist.

Nach alledem komme ich zu dem Schluss, dass für die Methode der Blutmischung behufs Zählung der Blutkörperchen die bisherige Form der Blutmischpipette als Hilfsmittel für eine exakte Forschung mir nicht genau genug erscheint.

Die Methode der Blutabmessung und Mischung mit getrennten Pipetten ist umständlich und führt nur dann zu einwandfreien Zählresultaten, wenn die Gewichte der beiden in die Pipetten eingesogenen Blut- und Verdünnungsflüssigkeitsmengen jedesmal ermittelt und die spezifischen Gewichte der Flüssigkeiten bestimmt werden, eine Arbeit, die jedenfalls als umfangreich und demgemäss auch als zeitraubend zu bezeichnen sein dürfte.

Die Fleischhauer'sche Blutmischpipette stellt wohl das zurzeit vollkommenste Instrument zur Ausübung einer sicheren Abmessung, Mischung und Übertragung der erforderlichen Flüssigkeitsmengen auf die Zählkammer behufs Zählung der Blutkörperchen dar und dürfte von den Hämatalogen bald als wertvolles Hilfsmittel ihrer Wissenschaft anerkannt werden.

Die Bürker'sche Behauptung, dass „die Mischung von Blut und Verdünnungsflüssigkeit derart, dass es zu einer gleichmässigen Verteilung der Blutkörperchen kommt, und die Übertragung des verdünnten und gemischten Blutes in den Zählraum unter Vermeidung von Entmischung die bedenklichste Handlung bei jeder Blutkörperchenzählung sei“, trifft nicht mehr auf die neue Form der Blutmischpipette zu; vielmehr dürfte jetzt der Schwerpunkt der bei der Blutkörperchenzählmethode auftretenden und bei der Berechnung zu berücksichtigenden Fehler in dem immer noch als mangelhaft anzusprechenden System der Zählkammern zu suchen sein.