III. Aus dem städtischen Krankenhause Gitschinerstrasse 104-105 in Berlin.

(Dirigirender Arzt: Prof. Dr. Litten.)

Eine Universalfärbemethode für Blutpräparate.

Von Dr. Leonor Michaelis, Assistenzarzt.

Die meisten der bisher üblichen Färbemethoden für Ausstrichpräparate von Blut, Eiter, Knochenmark und dergleichen haben den Nachtheil, dass sie nur Bruchstücke dessen zeigen, was in dem Präparat überhaupt durch Färbung darstellbar ist. So giebt die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin keinen Aufschluss über die neutrophilen und basophilen Granulationen, so dass die Mastzellen überhaupt nicht als solche kenntlich sind und die neutrophilen granulirten Myelocyten sich von den ungekörnten grossen mononucleären Zellen, ja selbst von manchen Formen der Lymphocyten nicht unterscheiden lassen. Die für das Studium der neutrophilen Granulationen so unentbehrliche sogenannte Triacidfärbung von Ehrlich verheimlicht die basophilen Granulationen völlig und verlangt ausserdem stets eine sorgfältige Fixation durch Hitze, wenn man sich auf eine vollständige Färbung der neutrophilen Granulationen verlassen will. Färbt man nach einander mit Eosin und Methylenblau, so gehen die neutrophilen Granulationen verloren. Die Chenzinsky'sche Färbung mit Methylenblau und Eosin ist etwas launenhaft und sehr langwierig. Die Romanowsky-Ziemann-Nocht'sche Färbung mit Methylenblau-

Eosin ist vielleicht unentbehrlich für das Studium der Plasmodien, ist aber sonst sehr zeitraubend und giebt oft schwer vermeidbare Farbniederschläge; ausserdem ist sie für die Färbung der Mastzellen unzuverlässig, weil sie eine rein wässrige Farblösung ist und die basophilen Körnchen, besonders, wie mir scheint, bei der myelogenen Leukämie, etwas wasserlöslich sind. Ueber die Verwerthbarkeit der von Rosin rein dargestellten neutralen Farbstoffe im Ehrlich'schen Sinn liegen noch keine Erfahrungen vor. Ehrlich hat ein Methylenblau-Eosingemisch angegeben, bei dem das Ausfallen des neutralen Farbstoffes durch den Zusatz von Methylal verhindert wird. Auch diese Methode ist nicht ganz sicher und gelingt, wie Ehrlich selber sagt, „nur an sorgfältig durch die Hitze fixirten Präparaten.“

Dieses Ehrlich'sche Prinzip, eine, die Bildung des Niederschlags verhindernde Substanz zuzusetzen, habe ich, angeregt durch Herrn Geheimrath Ehrlich selber, zum Theil in seinem Laboratorium, zum Theil in dem Laboratorium des städtischen Krankenhauses Gitschinerstrasse weiter verfolgt und bin dabei zu einem brauchbaren Gemisch gelangt, welches alles, was überhaupt beim Studium des gefärbten Blutpräparates in Betracht kommt, gleichzeitig auf einem Präparat zeigt: intensive Kernfärbung, neutrophile, eosinophile, basophile Granulation, Blutplättchen. Da das Gemisch nur 40% Wasser enthält, ist eine Lösung der basophilen Granulationen ausgeschlossen.

Als Zusatzflüssigkeit benutze ich nämlich Aceton und Alkohol in einem bestimmten Verhältniss. Setzt man einem Methylenblau-Eosingemisch Alkohol allein in einer Menge zu, die die Bildung des Niederschlags verhindert, so kann man niemals auch nur eine Spur von den neutrophilen Körnchen darstellen. Ich suchte daher den Alkohol durch eine andere, wasserlösliche Flüssigkeit zu ersetzen und versuchte es mit dem Aceton. Die Resultate waren befriedigend, aber es zeigte sich, dass Aceton die Bildung des Niederschlags nur für kurze Zeit aufhält. Dagegen erwies sich eine Mischung von Alkohol und Aceton als äusserst brauchbar. Da aber dieses Gemisch den Niederschlag auch nur etwa eine Stunde lang in der Schwebe hält, so bereite ich es mir jedesmal frisch. Im einzelnen verfare ich folgendermaassen:

Die Präparate werden für die Färbung entweder eine halbe bis höchstens 24 Stunden lang in absolutem Alkohol oder, was mir besonders bei sehr leukocytenreichen Präparaten von Vortheil scheint, nach der Ehrlich'schen Methode auf dem Kupferblech fixirt.

Ich halte mir zwei Stammlösungen vorrätzig:

I. 1%ige wässrige Lösung von krystallisirtem chemisch reinen, vor allem chlorzinkfreien Methylenblau.

II. 1%ige wässrige Lösung von Eosin (chemisch reinem Tetra-bromfluoresceinkalium).

Ein besonderer Werth ist auf die Beschaffenheit des destillirten Wassers zu legen, mit welchem die Lösungen hergestellt werden. Dasselbe muss möglichst frisch sein; es darf nicht lange in Glasgefässen aufbewahrt worden sein, weil es in diesen mit der Zeit alkalisch wird.

Als Indicator für die Alkalifreiheit des Wassers benutze ich eine concentrirte (etwa 1/2%ige) wässrige Lösung von Hämatoxylin. Ein Tropfen von dieser färbt eine Probe guten alkalifreien Wassers ganz leicht strohgelb, während altes destillirtes Wasser oder gar Leitungswasser purpurroth gefärbt wird.

Um auch fernerhin die Berührung der Farblösungen mit dem Glase zu verhindern und die Haltbarkeit der Lösungen zu erhöhen, giesse ich alle Flaschen, in denen ich die Lösungen aufbewahre, mit einer Schicht Paraffin aus.

Nun halte ich zwei Farblösungen vorrätzig:

A. Stammlösung I . . . 20,0

Alkohol absolutus . . 20,0

B. Stammlösung II . . . 12,0

Aceton (Sp. 56—58°) . 28,0

Wenn man die Farblösungen unter diesen Cautelen herstellt, so sind sie viele Wochen haltbar, wenigstens die rein wässrigen Stammlösungen und das Eosin-Acetongemisch. Nur das Methylenblau-Alkoholgemisch wird nach 14 Tagen bis 3 Wochen auch dann unbrauchbar, ohne dass ein Niederschlag entsteht oder sonst eine nachweisbare Veränderung mit demselben vorgehe. Diese Thatsache ist ebenso oft und sicher von mir festgestellt worden, wie sie mir unerklärlich ist.

Unmittelbar vor dem Gebrauch mische man je 1 ccm von A und B, giesse das Gemisch in ein Blockschälchen und decke das-

selbe sofort zu. Dann wird das fixirte und getrocknete Präparat mit der bestrichenen Seite nach unten in die Farblösung untergetaucht, wie es auch Ziemann für seine Methode empfiehlt. Das hat den Zweck, dass ein vorzeitig sich bildender geringer Niederschlag nicht auf die bestrichene Seite des Präparats fallen kann. Auch schwimmen lassen soll man das Deckglas nicht, weil der eventuell entstehende Niederschlag des neutralen Farbstoffes zum Theil als Oberflächenhäutchen auftritt und das Präparat beschmutzen würde.

Das Gelingen der Färbung hängt nun ganz von der Färbedauer ab. Die gewöhnliche Dauer beträgt eine halbe Minute bis höchstens zehn Minuten und ist für jeden Fall genau auszuprobieren. Man darf nicht eine einmal ausprobierte Dauer jedesmal anwenden, sondern muss sich nach folgendem Merkmal richten. Legt man das Präparat in die Farbflüssigkeit und betrachtet es nach einigen Secunden wieder, so hat es sich ganz blau gefärbt. Legt man es nun in die Farbflüssigkeit zurück, so wird der blaue Ton allmählich durch einen röthlichen verdrängt. Das erkennt man, wenn man das Deckglas für einen Augenblick aus der Flüssigkeit herausnimmt, dieselbe etwas ablaufen lässt und das Deckglas rasch bei durchfallendem Lichte betrachtet. Die Dauer der Färbung muss nun so lange sein, bis gerade der rothe Ton den blauen verdrängt hat. Wartet man länger, so tritt eine Entfärbung der Kerne ein, und das Präparat ist misslungen.

Die dicken Stellen, welche sich mitunter am Rande eines sonst gut ausgestrichenen Trockenpräparates finden, müssen um diese Zeit noch deutlich blau sein. Je dicker nämlich die Schicht des Präparates ist, desto mehr verzögert sich der Farbumschlag. Daraus folgt gleichzeitig, dass die Präparate für diese Färbung möglichst gleichmässig ausgestrichen sein müssen.

Bei Eiter- und Knochenmarkpräparaten, auch bei hochgradig leukämischem Blut, wo die rothen Blutkörperchen an Zahl zurücktreten, braucht man nur einen geringen Umschlag des Blau ins Violette abzuwarten. Wie schon erwähnt, ist der richtige Zeitpunkt für die Beendigung der Färbung in einer halben bis zehn Minuten erreicht. Dann wird das Präparat kurz abgespült und rasch zwischen Fliesspapier ohne Erwärmung getrocknet. Eine Erwärmung hat nämlich oft ein plötzliches Abblassen des Roths zur Folge.

Eine sehr auffällige Thatsache ist, dass zu verschiedenen Zeiten hergestellte Stammlösungen eine ganz verschiedene Färbedauer bedingen. Vor allem aber dauert die Färbung auch bei gleicher Farblösung und verschiedenen Blutsorten ganz verschieden. Auch habe ich einige Male versucht, das Gemisch für die Ausführung der Bremer'schen Reaction des Diabetesblutes anzuwenden, jedoch mit widersprechenden Resultaten.

Völlige Sicherheit in Bezug auf das Gelingen der Färbung erhält man folgendermaassen. Man färbe erst ein Präparat nach der beschriebenen Methode und merke sich genau die angewandte Zeitdauer. Findet man nun an dem fertiggestellten Präparat, dass die Kerne eine zu geringe Färbung haben, so färbe man sofort in demselben Farbgemisch ein zweites Präparat einige Zeit kürzer. Ist dagegen die Färbung der rothen Blutkörperchen zu matt oder zu blau, so färbe man ein zweites Präparat einige Zeit länger. Auf diese Weise wird man in jedem Fall zu einem brauchbaren, möglichst vielseitig gefärbten („panoptischen“) Präparat gelangen.

Sollte es sich ereignen, dass der Umschlag von Blau nach Roth zu schnell, schon nach einigen Secunden, eintritt, oder dass das Präparat sich sofort roth färbt, so verwerfe man die Stammlösungen und bereite sich dieselben frisch. Ganz frische Lösungen geben überhaupt stets die elegantesten Präparate.