Mikromethoden für die Untersuchung von Liquor cerebro-spinalis und Kammerwasser.

Von
Prof. F. Plaut.

(Aus der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie in München.)

(Eingegangen am 21. Januar 1921.)

Die Schwierigkeit, ausreichende Blutmengen für die Anstellung der Wassermannschen Reaktion zu gewinnen, eine Schwierigkeit, die besonders bei Säuglingen hervortrat, hat den Anlaß gegeben, sich für die Untersuchung kleiner Mengen von Seris einzurichten und Mikromethoden ausfindig zu machen. Auch für die Sachs-Georgische Reaktion sind bereits Mikromethoden empfohlen worden. Es ist wohl nicht zu bestreiten, daß bei den meisten Reaktionen mit absteigenden Volumina der Reagenzien die Exaktheit der Resultate sich verringert. Je kleiner die Flüssigkeitsmenge ist, desto mehr fallen Ungenauigkeiten der Abmessung ins Gewicht. Die bei den Versuchen zur Verwendung gelangenden Flüssigkeiten müssen zuverlässig und bequem abzumessen sein. Dies gilt besonders, wenn es sich um Massenuntersuchungen handelt. So halte ich es, um ein Beispiel zu geben, nicht für ratsam, bei der WaR., wo ja meist eine größere Anzahl Seris gleichzeitig in den Versuch eingestellt werden, unter 2½ ccm Gesamtvolumen herunterzugehen. Das Arbeiten mit kleinen Mengen möchte ich daher sowohl für die WaR. als für die S.-G.-R. als Methode der Wahl nicht empfehlen, denn es stellt zu große Anforderungen an die Aufmerksamkeit des Untersuchers.

Mit der Untersuchung kleinster Mengen von Spinalflüssigkeit hat man sich bisher weniger befaßt, da diese Körperflüssigkeit auch bei Kindern meist in so ausreichendem Maße zu gewinnen ist, daß die Versuche in der Regel mit größeren Mengen vorgenommen werden können. Zuweilen erhält man jedoch bei Spinalpunktionen nur sehr wenig Liquor, und bei gewissen Erkrankungen, z. B. Tumoren der hinteren Schädelgrube, ist es ratsam, sich auf die Entnahme weniger Tropfen zu beschränken. Daher stellt sich zuweilen auch bei der Liquoruntersuchung das Bedürfnis heraus, mit geringen Mengen auszukommen, um so mehr, als die Liquordiagnostik mit einer größeren Reihe von

Methoden als die Serodiagnostik zu arbeiten hat. Für die Untersuchung von Kammerwasser, das sich vom Menschen durch die Punktion der vorderen Kammer nur in der Menge weniger Tropfen gewinnen läßt, ist man gänzlich auf Mikromethoden angewiesen. Das gleiche gilt von der Anstellung von Reaktionen mit Kaninchenliquor, denn auch hier liefert das von mir empfohlene Punktionsverfahren am lebenden Tiere¹⁾ nur ein sehr geringes Quantum zutage.

Untersuchungen am Kammerwasser und Kaninchenliquor versetzten mich in die Zwangslage, mit minimalen Mengen arbeiten zu müssen. Es handelte sich nun darum, herauszufinden, wie es zu ermöglichen ist, mit wenig Material eine größere Reihe von Untersuchungen durchzuführen. Hierbei hat sich ergeben, daß man mit minimalen Mengen recht weit kommen kann, wenn man sich einer Anzahl von Handgriffen bedient. Ich glaube, daß es sich lohnt, eine Zusammenstellung der Literatur und meiner eigenen Erfahrungen zu geben, um andere, die ähnliche Untersuchungen vornehmen wollen, darüber zu informieren, wie sie es einrichten können, mit wenigen Tropfen auszukommen. Allerdings möchte ich nochmals betonen, daß die Mehrzahl dieser Mikromethoden nur für die Notlage gedacht ist, da sie eine so subtile Einstellung verlangen, wie sie nur für Sonderuntersuchungen angewendet werden kann.

Allgemeines über Mikromethodik.

Für die Untersuchung kleiner Mengen Liquor und Kammerwasser, z. T. auch für die Untersuchung kleiner Mengen Serum, kommen folgende Methoden in Betracht:

1. Tropfmethoden,
2. die Benutzung von sehr engen Pipetten,
3. die Untersuchung in Capillaren.

1. Tropfmethoden.

Bei der Anwendung von Tropfmethoden muß die jeweilige Größe der Tropfen Berücksichtigung finden. Die Tropfengröße ist abhängig von der Temperatur, der Abtropffläche und der Oberflächenspannung.

Die Temperatur ist praktisch der unwesentlichste Faktor, da die verschiedenen Versuchskomponenten auf die gleiche Temperatur gebracht werden können, und da überdies die Temperatur keinen erheblichen Einfluß auf die Tropfengröße ausübt. Untersuchungen mit dem Stalagmometer von Traube haben ergeben, daß eine Steigerung der Zimmertemperatur um 5° die Tropfenzahl von 100 Wassertropfen nur um etwa 1,22 Tropfen vermehrt.

¹⁾ Diese Zeitschr. 66.

Die Oberflächenspannung hingegen spielt eine für den Umfang des Tropfens wesentliche Rolle. Gleiche Volumina in ihrer Oberflächenspannung differenter Flüssigkeiten liefern unter den nämlichen Bedingungen in bezug auf Temperatur und Abtropffläche ungleiche Tropfenzahl. Je geringer die Oberflächenspannung, um so kleiner die Tropfen und um so größer die Tropfenzahl, welche eine bestimmte Flüssigkeitsmenge liefert.

Auch der dritte Faktor, die Abtropffläche, fällt für die Tropfenbildung ins Gewicht. Läßt man aus verschiedenen weiten Pipetten mit entsprechend verschieden weiten Ausflußöffnungen die gleiche Menge der gleichen Flüssigkeit austropfen, so erhält man recht verschiedene Werte. Während 1 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung aus einer auf $\frac{1}{100}$ geteilten 1-ccm-Pipette 21–23 Tropfen liefert, bringt die gleiche Flüssigkeitsmenge aus einer auf $\frac{1}{100}$ geteilten 10-ccm-Pipette nur 14–15 Tropfen. Dieser Umstand ist also zu berücksichtigen.

Um für die Tropfmethode, die uns hier angehen, brauchbare Resultate zu erhalten, muß man mit ausgeprobten Pipetten arbeiten. Für wässrige Flüssigkeiten benutze ich 1-ccm-Pipetten, die bei einer Temperatur von 15° aus 1-ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung 21 Tropfen ergeben. Eine Anzahl unter sich gleicher Pipetten läßt sich leicht herausfinden. Hierbei verfährt man am zweckmäßigsten so, daß man aus der bis zum obersten Teilstrich gefüllten Pipette jeweils eine gleich große Zahl von Tropfen, z. B. 10 Tropfen, abtropfen läßt und in dem Augenblick des Abtropfens des letzten Tropfens den Stand des Flüssigkeitsspiegels ermittelt. Dieser muß bei den verschiedenen Pipetten übereinstimmen. Unter Tropfen ohne nähere Bezeichnung verstehe ich solche aus einer derartigen Pipette.

Die Tropfenzahlen aus den verschiedenen, für die Tropftechnik hier Betracht kommenden wässrigen Flüssigkeiten zeigen nur unerhebliche Divergenzen, die bei 1 ccm nur Teile eines Tropfens, selten einen vollen Tropfen ausmachen. Hierauf wurden physiologische Kochsalzlösung, Spinalflüssigkeiten, Sera bzw. deren Verdünnungen mit Kochsalzlösungen, 5 proz. Hammelblutemulsion + verdünntes hämolytisches Serum ana und Goldsole geprüft. Mit all diesen Medien erhält man ungefähr 21 Tropfen. Die Fehlerquelle, die gleichwohl in der nicht ganz exakten Abmessung liegt und die beim Austropfen größerer Mengen mit Benutzung des Stalagmometers nachweisbar ist, erscheint mir für unsere Zwecke so unerheblich, daß man sie übersehen darf.

Anders liegen jedoch die Verhältnisse bei Benutzung alkoholischer Flüssigkeiten, die infolge ihrer geringeren Oberflächenspannung aus dem gleichen Volumen eine erheblich größere Tropfenzahl entwickeln. So lieferten mit der 1-ccm-Pipette cholesterinierte alkoholische Herzextrakte in der Verdünnung 1 : 5 Kochsalzlösung, wie man sie für die

WaR. bzw. für die S.-G.-R. anwendet, 38 Tropfen, die gebrauchsfertige Mastixemulsion 38—39 Tropfen aus 1-ccm gegenüber 21 Tropfen der genannten wässrigen Substrate. Daher würde man die alkoholischen Versuchskomponenten unterdosieren, wenn man für sie die gleichen Pipetten wie für die wässrigen Versuchskomponenten benutzen wollte. Um in Tropfenform alkoholische Medien in dem gleichen Quantum wie wässrige Medien einzufüllen, muß man Pipetten anwenden, die so weit sind, daß 1 ccm alkoholischer Flüssigkeit die gleiche Tropfenzahl liefert, wie man sie für wässrige Flüssigkeiten aus der 1-ccm-Pipette erhält, d. h. 21 Tropfen. Zur Erfüllung dieses Postulates geeignete Pipetten finden sich unter den Laboratoriumspipetten, welche 10-ccm in 100 Teile geteilt fassen. Diese sind in entsprechender Weise wie die 1-ccm-Pipetten auszuprobieren. Zwischen den Gebrauchsverdünnungen von Herzextrakten und von Mastixemulsionen sind die Unterschiede in der Tropfengröße so gering, daß man sie mit denselben 10-ccm-Pipetten behandeln kann.

2. Benutzung von Mikropipetten.

Um sehr kleine Flüssigkeitsmengen zu pipettieren, kann man sich der von der Firma F. und M. Lautenschläger, Berlin, hergestellten Mikropipette, enthaltend 0,1-ccm in $\frac{1}{100}$ geteilt, oder des ausgezogenen Teiles einer Leukocytenmischpipette bedienen.

Bei einiger Übung macht es keine Schwierigkeit, die Flüssigkeiten beim Aufsaugen exakt abzumessen. Man erleichtert sich den Vorgang, wenn man die Pipette mit einem langen Gummischlauch versieht, so daß man die Möglichkeit hat, in jeder Lage alle Teile der Pipette in Augenhöhe zu bringen (die an den Leukocytenpipetten befindlichen Schläuche sind hierfür zu kurz). Ebenso wohl kann man Saugkappen benutzen.

Was das Ausblasen der Flüssigkeit aus den engen Pipetten betrifft, so ist das Volumen der völlig gefüllten Pipetten groß genug, um ohne verhältnismäßig erheblichen Verlust herausgebracht zu werden. Es bleiben aber doch immer Reste in der Pipette und besonders an deren Ausflußöffnung zurück, die ins Gewicht fallen, wenn es sich um kleinste Mengen handelt, welche nur einen Teil der Pipette füllen. Es ist daher nicht zweckmäßig, in ein trockenes Gläschen solche geringen Mengen auszublasen. Erlaubt es die Versuchsanordnung, in eine bereits im Glas befindliche Flüssigkeit hineinzupipettieren, so bietet dies einen Vorteil, da man durch mehrfaches Aufsaugen und Ausblasen wohl die ziemlich vollkommene Entleerung des Pipetteninhalts erreichen kann. Hat man Bruchteile von 0,1 ccm verschiedener Flüssigkeiten zusammenzubringen, so vermeide man getrenntes Pipettieren, sauge vielmehr nacheinander die Mengen auf und blase den ganzen Inhalt

zugleich aus. Für eine gleichmäßige Herausbeförderung der Anteile Sorge man durch wiederholtes Aufsaugen.

Bei noch so sorgfältiger Technik ist es nicht zu vermeiden, daß die Mikropipetten etwas Material „schlucken“, ein Umstand, der bei sehr geringen Quantitäten eine nicht zu leugnende Fehlerquelle bedeutet. Demgegenüber haben Tropfmethoden den Vorzug, daß kein Materialverlust beim Einfüllen in das Reagensglas entsteht. Man kann sagen, die Pipettiermethoden gestatten exakteres Abmessen, die Tropfmethoden exakteres Einfüllen.

3. Reaktion in Capillaren.

Man kann capillare Flüssigkeitsmengen nacheinander in eine Capillare eintreten lassen und etwaige Ausflockungen an der Berührungszone der Flüssigkeiten in der Capillare beobachten. Näheres hierüber bei der Beschreibung der Ausführung von Nonnes Phase I.

Zellzählung.

In Betracht kommt nur die Zählkammermethode. Für die Zellzählung in der von Fuchs und Rosenthal angegebenen Zählkammer braucht man nicht mehr Liquor, als zur Füllung einer Kammer ausreicht. Das ist etwa die Hälfte eines Tropfens.

Verzichtet man auf die Färbung, so vollzieht sich der Akt sehr einfach, indem man mit Platinösen oder einer Capillare die nötige Menge in die Kammer einbringt. Die Zählung des ungefärbten Präparates ist etwas zeitraubend, aber bei einiger Übung doch recht schnell zu erledigen. Die Färbung zu unterlassen bietet sogar insofern einen Vorteil, als eine Verwechslung kleiner Lymphocyten mit roten Blutkörperchen in dem ungefärbten Präparat weniger leicht möglich ist als in dem gefärbten, wie auch schon Frankhauser und Frenkel-Heiden betont haben. Benutzt man die für den Liquor meist verwendete Farblösung (Methylviolett 0,2, Acid. acet. glac. 4,0, Aq. dest. 100), so färbt sich trotz der Essigsäure sehr häufig ein Teil der Erythrocyten an und hält die Farbe auch nach längerer Einwirkung, wodurch Anfänger leicht irreführt werden können.

Will man auf den Farbstoff nicht verzichten, so kann man verschiedene Wege einschlagen. Entweder läßt man etwas Farbe, z. B. wässrige Methylblaulösung 1:500, auf dem Boden der Kammer eintrocknen und bringt Liqor darauf. Das Farbdepot schwemmt man mittels einer Platinnadel im Liquor auf. Die Zellen nehmen den Farbstoff langsam auf, so daß man gut daran tut, erst nach etwa einer halben Stunde die Zählung vorzunehmen. Methylviolett ist ungeeignet, da es bei dieser Anwendungsweise zu starke Niederschläge liefert. Oder man mischt den Liquor mit der flüssigen Farbe in Pipetten. Bei der im allgemeinen

benutzten Leukocytenmischpipette wird der Farbstoff bis zur Marke 1, der Liquor über die Ampulle hinweg bis zum Teilstrich 11 aufgesogen. Das Verhältnis der Farblösung zu Liquor ist innerhalb der Ampulle 1 : 9. (Der ungefärbte Liquor in dem ausgezogenen Teil der Pipette kommt nicht in Rechnung, da er nicht verwertet wird.) Der ausgezogene Teil der Mischpipette von der Ausflußöffnung bis zur Markierung 1 ist graduirt in 10 Teile. Saugt man bis zum untersten Teilstrich Farbflüssigkeit und dann Liquor über die weiteren 9 Teilstriche bis zur Marke 1 auf, so hat man das gleiche Verhältnis zwischen Farbe und Liquor wie bei Benutzung der ganzen Pipette. Zweckmäßig ist es, zuerst den Liquor bis zum 9. Teilstrich aufzunehmen und die Farbflüssigkeit folgen zu lassen; hierdurch vermeidet man, daß der Liquorrest, den man meist noch für andere Untersuchungen benötigt, mit dem Farbstoff in Berührung kommt. Die von mir geprüften Leukocytenpipetten lieferten durchschnittlich 15 Tropfen. Diese Tropfen haben wesentlich kleineres Volumen als die aus einer 1-ccm-Pipette heraus tretenden Tropfen. Ein Tropfen der 1-ccm-Pipette entspricht etwa $1\frac{1}{2}$ Tropfen der Leukocytenpipette. Für die Füllung der ganzen Leukocytenpipette reichen somit 10 Tropfen der 1-ccm-Pipette. Der graduirte Anteil der Leukocytenpipette faßt also nicht ganz einen vollen Tropfen der 1-ccm-Pipette. Mit dieser geringen Menge läßt sich die Zellzahl ausreichend exakt ermitteln. Man bläst den etwa 1 Tropfen betragenden Inhalt der Pipette in ein kleines Spitzgläschen, saugt 1—2 mal auf, um eine gute Vermischung zu erhalten, und füllt nun die Kammer. Vergleichende Zellzählungen mit Benutzung der ganzen Pipette und des capillaren Anteils derselben stimmen recht gut überein.

Hat man so wenig Liquor, daß man nicht einen Tropfen opfern will, und legt man gleichwohl Wert darauf, den Liquor mit flüssiger Farbe im genannten Verhältnis zu versetzen, so kann man auch mit der Hälfte des graduirten Teils der Mischpipette auskommen, indem man über $4\frac{1}{2}$ Teilstriche Liquor aufzieht und danach $\frac{1}{2}$ Teilstrich Farbe eintreten läßt. Auch auf diese Weise läßt sich die Zellzahl noch mit leidlicher Exaktheit feststellen.

Ich führe die Resultate einiger vergleichender Zellzählungen an, die bei Benutzung der ganzen Mischpipette (A), des ausgezogenen Teils bis zur Marke 1 (B) bzw. bis zur Marke 0,5 (C) erhalten wurden.

A	B	C
58	56	—
44	47	—
$2\frac{1}{3}$	3	$2\frac{1}{3}$
$44\frac{1}{3}$	48	$47\frac{2}{3}$
5	4	$4\frac{1}{3}$
121	109	100

Ebensowohl kann man eine 0,1 ccm fassende Mikropipette benutzen, benötigt hierbei allerdings, wenn man die ganze Pipette füllt, mehr Material, etwas über 2 Tropfen.

Bestimmung des Gesamteiweißes.

Die refraktometrische Bestimmung des Eiweißgehaltes ist allen anderen Methoden durch schnelle und einfache Handhabung sowie dadurch überlegen, daß 1 Tropfen Flüssigkeit für die Untersuchung ausreicht. So ausgezeichnet verwertbar sie jedoch für eiweißreiche Flüssigkeiten wie z. B. Serum ist, läßt sie bei eiweißarmen und noch dazu kochsalzhaltigen Medien wie Liquor und Kammerwasser im Stich, da minimale Eiweißmengen sich nicht mehr exakt auf diese Weise feststellen lassen. Von den für die Anwendung bei größeren Liquormengen gebräuchlichen Methoden scheidet die Esbachprobe nach Nissl aus, da sie 2 ccm Liquor verlangt. Aus dem Grade der Trübung, die nach Zusatz eiweißfällender Mittel eintritt, kann man durch Vergleich mit Testgläsern von bekanntem Eiweißgehalt Anhaltspunkte für die jeweils vorhandene Eiweißmenge gewinnen, und dieser Weg ist auch für kleine Flüssigkeitsmengen gangbar. Für die Untersuchung des Kammerwassers des Kaninchens hat Wessely¹⁾ sich des Esbachschen Reagenses (2 Tropfen Kammerwasser + 2 Tropfen Reagens) sowie einer 10proz. Tanninlösung bedient. Wessely gibt an, man könne auf diese Weise den Eiweißgehalt auf 0,015% genau schätzen, wenn er sich in den Grenzen zwischen 0,01 und 0,1% bewege. Bei höherem Eiweißgehalt würden die Schätzungen ungenau. Mestrezats Fällungsmethode mit Trichloressigsäure würde sich natürlich auch für kleine Mengen einstellen lassen können, aber ihrer Anwendung sind hinsichtlich der Genauigkeit des Ergebnisses die gleichen Grenzen gezogen, die Wessely bei seinem Vorgehen gefunden hat. Hingegen dürfte die Salpetersäureschichtprobe allen Ansprüchen genügen.

Diese von Roberts-Stolnikoff-Brandberg für die quantitative Eiweißbestimmung im Urin angegebene Methode geht darauf aus, diejenige Verdünnung des Urins zu ermitteln, bei der nach Unterschichtung mit Salpetersäure innerhalb 3 Minuten noch ein schwacher, aber deutlicher Ring sichtbar wird; das Phänomen ist nach Brandbergs Untersuchungen noch bei einem Eiweißgehalt von $\frac{1}{30}$ Promille zu erwarten. Tritt z. B. noch bei einer 30fachen Verdünnung des Urins die Reaktion auf, so enthält dieser 30 mal $\frac{1}{30}$ Promille = 1 Promille Eiweiß.

Für den Liquor ist diese Methode von von Pfaundler²⁾ erfolgreich in Anwendung gebracht worden. Zaloziecki³⁾ hat sie dann weiterhin

¹⁾ Arch. f. Ophthalm. 50, 123. 1900.

²⁾ Lumbalpunktionen an Kindern, Wien 1899.

³⁾ Dtsch. Zeitschr. f. Nervenheilk. 47/48, 783. 1913.

ausgebaut. Es wird so vorgegangen, daß man 0,5 ccm Liquor mit 4,5 ccm physio'ogischer Kochsalz'ösung versetzt. Von dieser Stammlösung, die den Liquor in der Verdünnung 1:10 enthält, werden durch weiteren Zusatz variierter Mengen von Kochsalz'ösung in engen Röhrchen Verdünnungen gemacht. Man unterschichtet mit Salpetersäure mittels einer feinausgezogenen Capillare, ausgehend von dem stärksten Verdünnungsgrad. Die Beobachtung erfolgt in einem mit Tusche geschwärzten Kasten mit Belichtung von Oben, nach den Angaben von Zaloziecki. Es wird festgestellt bis zu welcher Verdünnung nach 3 Minuten noch eine Ringbildung an der Schichtgrenze wahrzunehmen ist. Diese Grenzverdünnung entspricht nach Zalozieckis Feststellungen einem Eiweißgehalt von $\frac{1}{60}$ Promille.

Unter Zugrundelegung dieses Wertes hat Grahe¹⁾ eine Tabelle aufgestellt, die den den verschiedenen Verdünnungen entsprechenden Eiweißgehalt in Promille abzulesen gestattet.

Beim menschlichen Liquor liegt eine sichere Vermehrung des Gesamteiweißes vor, wenn noch bei der Verdünnung 1 : 25, d. h. bei einem Eiweißgehalt von $\frac{5}{12}$ Promille, die Schichtprobe positiv ausfällt. Auf diese einzige Probe kann man sich beschränken, wenn eine genaue Ermittlung der Eiweißmenge nicht beabsichtigt ist und man lediglich feststellen will, ob eine Vermehrung vorliegt. Bisgaard²⁾ hat als Schnellmethode dieses Vorgehen empfohlen. Er verdünnt im Verhältnis von 1 : 25, indem er 0,1 Liqor zu 2,4 ccm Kochsalzlösung gibt. 3 Minuten nach Zusatz der Salpetersäure notiert er das Resultat:

keine oder zweifelhafte Ausfällung	= negative Reaktion;
schwache, aber sichtbare Ausfällung	= schwach positive Reaktion;
stärkere Ausfällung	= positive Reaktion.

Salpetersäureprobe mit kleinen Mengen.

Um Liqor (bzw. Kammerwasser) zu sparen, kann man für die Orientierungsprobe nach Bisgaard anstatt 0,1 Liqor 1 Tropfen Liqor nehmen — was weniger als die Hälfte ist — und mit der entsprechenden Menge Kochsalz'ösung = 24 Tropfen verdünnen. Die Benutzung von Mikropipetten gestattet wohl, noch etwas weiter herunterzugehen, etwa auf 0,03 ccm Liqor unter Hinzufügung von 0,27 ccm Kochsalz'ösung.

Will man den Promillegehalt an Eiweiß genauer ermitteln, so ist es ratsam, die sehr sparsame Bisgaardsche Probe als Stichprobe vor auszuschicken, wenn man nicht schon von vornherein einen höheren Eiweißgehalt erwartet. Danach kann man ermessen, ob man nach oben oder nach unten weiterhin auszutitrieren hat. 2 Tropfen Liqor

¹⁾ Diese Zeitschr. **24**, 97. 1914.

²⁾ Diese Zeitschr. **14**, 329. 1913.

genügen im Notfalle, um nahezu das ganze Grahesche Schema durchzuführen. Fügt man zu 2 Tropfen Liquor 18 Tropfen Kochsalzlösung, so hat man 20 Tropfen der Verdünnung 1 : 10. Nun wird weiter mit dem Tropfen als Einheit verdünnt. Die jeweilige Tropfenzahl der Liquorverdünnung und der Kochsalzlösung, die man benötigt, ist aus der von mir für die Tropfmethode umgearbeiteten Graheschen Tabelle zu ersehen. Die 2. Verdünnung (1 : 12) habe ich nicht eingetragen, da sie eine relativ sehr hohe Tropfenzahl benötigt (5 Tropfen der 10 proz. Liquorverdünnung und 1 Tropfen Kochsalzlösung) und wohl meist entbehrlich ist. Der Gesamtverbrauch an 10 proz. Liquor für die Vornahme der ganzen Prozedur beträgt 19 Tropfen. Die Proben werden in engen Gläschen angesetzt. Die Unterschichtung mit Salpetersäure wird wie bei dem Originalverfahren vorgenommen. Die Tropfmethode beansprucht nur etwa $\frac{1}{3}$ der Liquormenge, die nötig ist, um die Reihen mit der Pipette nach der Vorschrift Grahes herzustellen.

Versuchsanordnung nach Grahe, umgearbeitet für die Tropfmethode.

Stammlösung 1 : 10 2 Tropfen Liquor + 18 Tropfen NaCl-Lösung	Wird vermischt mit physiolog. NaCl- Lösung	Entspricht einer Ver- dünnung des Liquors von	Nach 3 Minuten eben sichtbarer Ring ent- spricht einem Eiweiß- gehalt von
Tropfenzahl	Tropfenzahl		‰
1	0	1 : 10	$\frac{1}{6}$
2	1	1 : 15	$\frac{1}{4}$
1	1	1 : 20	$\frac{1}{3}$
2	3	1 : 25	$\frac{5}{12}$
1	2	1 : 30	$\frac{1}{2}$
1	3	1 : 40	$\frac{2}{3}$
1	4	1 : 50	$\frac{3}{4}$
1	5	1 : 60	1
1	6	1 : 70	$1\frac{1}{6}$
1	7	1 : 80	$1\frac{1}{3}$
1	8	1 : 90	$1\frac{1}{2}$
1	9	1 : 100	$1\frac{2}{3}$
1	11	1 : 120	2
1	12 ($\frac{1}{2}$)	1 : 135	$2\frac{1}{4}$
1	14	1 : 150	$2\frac{1}{2}$
1	15	1 : 165	$2\frac{3}{4}$
1	17	1 : 180	3

Globulinproben.

A. Nonnes Phase I.

1. Tropfmethode.

Zur Anstellung der Reaktion werden gleiche Teile Liquor und heiß-gesättigte Ammoniumsulfatlösung im Reagensglas vermischt. Bei normalem Globulingehalt bleibt das Gemisch klar, bei erhöhtem treten je nach dem Maße der Globulinvermehrung hinsichtlich der Intensität

sich gut abstufende Grade der Opaleszenz bzw. der Trübung auf. Im allgemeinen wird von beiden Flüssigkeiten $\frac{1}{2}$ ccm genommen. Benutzt man enge Gläschen, so kann man die Menge verringern. Es kommt darauf an, daß die Flüssigkeitssäule genügende Höhe hat, damit eine ausreichende Beobachtungszone oberhalb des stark reflektierenden und unregelmäßig lichtbrechenden Bodens des Reagensglases bleibt. Bei Gläschen von 5–6 mm lichter Weite geben 2 Tropfen eine Flüssigkeitssäule von 5 mm Höhe. Daran kann man mühelos die Grade der Opaleszenz feststellen. 1 Tropfen Liquor + 1 Tropfen Ammoniumsulfatlösung genügen daher bei dieser Technik zur Ausführung der Probe. Die Tropfengröße von Liquor und von Ammoniumsulfatlösung differiert nur unwesentlich. Zweckmäßig geht man, um Materialverlust durch Benetzung der Wandungen zu vermeiden so vor, daß man mit einer schlanken 1-ccm-Pipette bis fast zum Grunde des Glases hinabgeht und dann erst abtropfen läßt. 5 mm Weite des Glases genügt, um den freien Fall des Tropfens zu ermöglichen.

2. Capillarmethode.

Hauser¹⁾ hat im Jahre 1904 empfohlen, die Präcipitationsprobe für den forensischen Blutnachweis bei sehr geringer Menge des Untersuchungsmaterials sich in der Capillare abspielen zu lassen. Nacheinander ließ er das präcipitierende Kaninchenserum und die auf menschliches Eiweiß suspekten Untersuchungsflüssigkeit in eine Capillare eintreten. Bei positivem Ausfall trat an der Grenzschicht eine Ringbildung auf, die mittels der Lupe wahrzunehmen war. Soweit mir bekannt ist, hat die Methode wenig Anwendung gefunden, was wohl seine Ursache in der Schwierigkeit, die Präcipitationsbildung zu erkennen, gehabt haben mag. Das Agglutinoskop bietet nunmehr die Möglichkeit, die Vorgänge in der Capillare auf das genaueste zu beobachten, und mit seiner Hilfe hat sich mir die Capillarmethode für die Nonnesche Globulinprobe sehr bewährt. Der Vorteil, den sie gegenüber der Tropfmethode bietet, liegt in dem weit geringeren Materialverbrauch; sie verlangt nur den Bruchteil eines Tropfens. Mit 1 Tropfen kann man 8–10 Capillarreaktionen anstellen. Man braucht lang ausgezogene, etwas weite Capillaren. Zuerst läßt man den Liquor eintreten. Nunmehr hält man die Capillare horizontal und taucht in dieser Haltung die Capillare in Ammoniumsulfatlösung; das Aufsaugen in horizontaler Lage läßt sich bewerkstelligen, indem man ein Reagensglas bis zum Rande mit der Lösung füllt oder diese auf einen Objektivträger auftröpfelt. Die horizontale Lage der Capillare ist weiterhin beizubehalten, um das Vermischen der Flüssigkeiten zu verhindern. Man beobachtet im abgeblendeten Agglutinoskop, d. h. auf dunklem Grunde, die Grenz-

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. Nr. 7, 1904.

zone der Flüssigkeiten und sieht nun sofort oder erst nach einigen Minuten, je nach dem Globulingehalt verschieden starke Ausflockungen auf das deutlichste hervortreten. Die Capillaren müssen tadellos sauber sein. Das erreicht man leicht durch Abwischen mit einem mit Äther befeuchteten Löffchen. Genau genommen handelt es sich nicht um die Mischprobe nach Nonne, sondern um die Überschiebungssprobe nach Ross-Jones, oder vielmehr um ein Mittelding zwischen beiden. Man erhält nämlich in der Capillare nie eine scharfe Ringbildung, vielmehr nimmt die Trübung immer eine etwas breitere Zone ein.

B. Carbolsäureprobe.

Bei der Carbolsäureprobe nach Pand y läßt man nach der Originalvorschrift 1 Tropfen Liquor in Carbolsäure fallen. Bei positivem Ausfall der Reaktion bilden sich an der Berührungsgrenze der Flüssigkeiten rauchwolkenähnliche Trübungen. Man erhält bei weitem die besten Resultate, wenn man die Carbo'säure nach den Angaben von Zaloziecki herstellt. Hierbei verfährt man so, daß man 80–100 g Acid. carbolicum liquifacitum mit 1 l Aqua destillata versetzt; gut durchgeschüttelt, mehrere Stunden bei 37° und danach etwa 1 Woche bei Zimmertemperatur stehenläßt. Nunmehr wird das mit Carbolsäure gesättigte Wasser von der öligen Carbolsäureunterschicht abgehebert und zur Anstellung der Reaktion benutzt.

Die Methode ist also schon von vornherein als Mikromethode gedacht und der geringe Materialverbrauch, den sie fordert, ist immer als ein Vorteil gegenüber anderen Globulinfällungsmethoden bezeichnet worden. Wie oben erwähnt, läßt sich jedoch auch die Nonnesche Probe mit 1 Tropfen anstellen. Es fragt sich nun, ob man die Pandysche Probe mit weniger als einem Tropfen machen kann. Für die Capillarmethode eignet sie sich nicht. Bei ihrer Anwendung kommen nur sehr starke Ausfällungen heraus. Hingegen genügt die Füllung einer größeren Platinöse, die ja wesentlich weniger als 1 Tropfen faßt, die Reaktion in einem Uhrschildchen herbeizuführen. Man füllt ein Uhrschildchen zur Hälfte mit Carbolsäure und läßt am Rande der Flüssigkeit den Liquor in die Carbolsäure eintreten. Beobachtungen auf dunklem Grunde und bei geeigneter Lichteinstellung sind erforderlich.

C. Sublimatprobe.

Die von Weichbrodt angegebene Sublimatprobe wird ausgeführt, indem man 3 Teile 1proz. Sublimatlösung mit 7 Teilen Liquor vermischt (0,3 Sublimatlösung und 0,7 Liquor sind die üblichen Mengen). Der positive Ausfall gibt sich hier in verschiedenen Graden von Trübung zu erkennen.

Man kann den Materialverbrauch über die Hälfte einschränken, wenn man anstatt 0,7 ccm Liquor 7 Tropfen Liquor nimmt und 3 Tropfen Sublimatlösung hinzufügt. Um die Menge noch weiter herabzusetzen, bedient man sich der Mikropipette. Man saugt 0,07 Liquor und 0,03 Sublimatlösung auf, bläst in ein enges Röhrchen aus und sorgt durch nochmaliges Aufziehen- und Ausfließenlassen für einen gleichmäßigen Austritt des Pipetteninhalts. 0,07 ccm sind fast 2 Tropfen; somit ist auch bei dieser verringerten Dosis der Verbrauch ein relativ erheblicher.

Kolloidchemische Reaktionen.

A. Goldsolreaktion.

Zur Anstellung der Goldsolreaktion nach der Vorschrift Langes braucht man 0,2 ccm Liquor. Man stellt eine Serie von 12 Reagensgläsern auf. In das erste Glas kommt 0,2 Liquor und 1,8 ccm 0,4 proz. Kochsalzlösung. In die übrigen 11 Gläser wird je 1 ccm Kochsalzlösung gegeben. Man überträgt aus dem 1. Glas 1 ccm in das zweite und transportiert weiterhin jeweils 1 ccm von dem vorhergehenden zu dem nächsten Glas über die ganze Reihe hin. Nach Entfernung des überschüssigen 2. ccm aus dem 12. Glas beträgt der Inhalt eines jeden Glases 1 ccm. Nunmehr werden 5 ccm Goldsole jedem Glas zugesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt somit 6 ccm.

Mikromethode.

Gesamtmenge des für die Reaktion notwendigen Liquors: 1 Tropfen — somit etwa $\frac{1}{4} - \frac{1}{5}$ von 0,2 ccm, wie es die Originalvorschrift verlangt. In das erste Reagensglas kommen außer dem Tropfen Liquor 9 Tropfen Kochsalzlösung, in die übrigen Gläser je 5 Tropfen. Nunmehr werden beim ersten Glas beginnend jeweils von einem Glas zu dem nächsten 5 Tropfen übertragen. Aus dem 12. Glas werden 5 Tropfen entfernt. Zu den nun in jedem Glas befindlichen 5 Tropfen werden 25 Tropfen Goldsole zugesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt sonach 30 Tropfen, was etwa $1\frac{1}{2}$ ccm entspricht. Angesichts dieser ziemlich erheblichen Flüssigkeitsmenge kann man für die Reaktion große Reagensgläser verwenden. Ich benutze Gläser von 12 mm lichter Weite und 10 ccm Höhe. Die Resultate dieser Mikromethode mit der Originalmethode stimmen völlig überein.

B. Mastixreaktion.

Die Originalmethode Emanuels arbeitet mit 0,5 ccm Liquor, dem 1,5 ccm 1,25 proz. Kochsalzlösung zugesetzt werden. Drei weitere Röhrchen enthalten 1,0 der Kochsalzlösung. Durch Übertragung von je 1 ccm vom ersten Glas ausgehend jeweils in das nächste werden

vier Verdünnungen in der Menge von je 1 ccm hergestellt (aus dem 4. Glas wird der überschüssige ccm herausgenommen). Zusatz von 1 ccm Mastixemulsion für jedes Glas. Gesamtvolumen 2 ccm.

Mikromethode.

In das erste Glas kommen 3 Tropfen, in die übrigen Gläser je 2 Tropfen 1,25 proz. Kochsalzlösung. In das 1. Glas wird 1 Tropfen Liquor gegeben und von dem ersten Glas anfangend werden jeweils 2 Tropfen übertragen. Nach Entfernung der überschüssigen 2 Tropfen aus dem 4. Glas enthält somit jedes Glas 2 Tropfen Flüssigkeit. Zusatz von 2 Tropfen Mastixemulsion für jedes Glas, wobei die geringere Tropfengröße der Mastixemulsion beachtet werden muß (s. S. 375). Gesamtvolumen somit pro Glas 4 Tropfen. Die Reaktion muß in engen Gläschen von höchstens 8 mm lichter Weite angestellt werden.

Die Modifikation der Mastixreaktion nach Jacobsthal und Kafka verlangt die doppelte Menge Liquor als die Originalmethode, da zwei Reihen mit verschieden konzentrierter Kochsalzlösung angestellt werden: a-Kurve und b-Kurve. Begnügt man sich mit Anstellung der b-Kurve, worauf man sich, zumal wenn Materialmangel besteht, beschränken kann, so werden 0,5 ccm Liquor benötigt.

Mikromethode.

Vorgehen wie bei der für die Originalmethode empfohlenen Mikromethode mit entsprechender Ausdehnung der Verdünnungen über eine größere Reihe von Gläsern. Der Verbrauch an Liquor für die b-Kurve beträgt 1 Tropfen, für die a- und b-Kurve 2 Tropfen.

Wassermannsche Reaktion.

Bisher sind folgende Mikromethoden in Vorschlag gebracht worden.

1. Mikromethode nach Weidanz¹⁾.

Die notwendigen Verdünnungen werden mit Hilfe von feinen Thermometerpipetten (0,1 ccm geteilt in 100 Teile) hergestellt. Um die kleinen Flüssigkeitsmengen möglichst vor Verdunstung zu schützen, sind die Verdünnungen zweckmäßig in kleinen Röhrchen, die durch einen Korkpfropfen gut verschlossen werden können, vorzunehmen. Von den verdünnten Lösungen (Komplement, Untersuchungsserum und syphilitischer Leberextrakt) werden dann gleiche Mengen, z. B. je 0,05 ccm, in ein kleines Reagensglas von 6 cm Länge und 0,6 cm Durchmesser gebracht und sorgfältigst miteinander gemischt. Nach 1 Stunde

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1908, S. 2240.

Aufenthalt im Brutschrank wird das Gemisch mit gleichen Mengen, also mit je 0,05 ccm Amboceptorverdünnung und 5 proz. Hammelblutlösung versetzt und abermals eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Stehen für den Versuch von den einzelnen Verdünnungen aber nur je 0,02 ccm zur Verfügung, so empfiehlt es sich, das Gemisch mit Hilfe einer Capillarpipette in ein kleines Röhrchen von 2 mm Durchmesser zu bringen. Die notwendigen Kontrollen werden in ähnlicher Weise hergestellt. Beobachtung der Hämolyse in einem eigens konstruierten durchsichtigen Brutschrank.

2. Mikromethode nach Mulzer¹⁾.

Im Prinzip wie die Weidanzsche Methode, nur unter Anwendung etwas größerer Mengen, um die Umständlichkeit und Schwierigkeit der Weidanzschen Versuchsanordnung zu verringern. 0,05 ccm Serum wird mit 4 Teilen Kochsalzlösung verdünnt, so daß die Gesamtmenge der Untersuchungsflüssigkeit 0,25 ccm beträgt, von der man mit einer gewöhnlichen 1-ccm Pipette je 0,1 ccm für die Reaktion selbst und für die nötige Serumkontrolle abnehmen kann. Setzt man nun von den in demselben Verhältnis wie bei der großen WaR. (mit 0,2 ccm Serum) gemischten übrigen Komponenten je 0,1 ccm hinzu, so kommen am Ende der Reaktion 0,4 bzw. 0,5 ccm Flüssigkeit in ein Röhrchen. Mit diesen Mengen kann man die Reaktion in Uhlenhutschen Röhrchen ausführen.

3. Mikromethode nach Sormani²⁾.

Pipettiermethode unter Verwendung der Wrightschen für den Phagocytoversuch angegebenen Capillaren, die vom Untersucher zu graduieren sind und mit Saugkappen versehen werden. Die Einzelvolumina der Untersuchungsflüssigkeiten und der Komponenten betragen ungefähr 0,03 ccm, das Gesamtvolumen somit $0,03 \text{ mal } 5 = 0,15 \text{ ccm}$. Einschließlich der Liquorkontrolle ist der Bedarf an Liquor 0,06 ccm. Das Arbeiten mit Wrights „Throttled pipette“ verlangt besondere Einübung.

4. Tropfmethode nach R. Müller³⁾.

Im Gegensatz zu der Methodik von Weidanz, Mulzer und Sormani wird von R. Müller anstatt mit Pipetten mit der Tropftechnik gearbeitet. In das Versuchsglas werden 50 Tropfen Kochsalzlösung gegeben. Zusatz von 1 Tropfen Patientenserum, 4–6 Tropfen alkoholischer Rinderherzextrakt und 1 Tropfen Komplement. Einstellung

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1909, S. 1231.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **11**, 260. 1911.

³⁾ Serodiagnose der Syphilis, Berlin 1913.

in den Brutschrank für 1 Stunde. Danach Zusatz von 1 Tropfen 50 proz. Hammelblut und 1 Tropfen hämolytischem Serum mit dem dreifachen Titer. Die Kontrollen werden entsprechend angelegt. Die Gläser enthalten somit annähernd 60 Tropfen — etwa 3 ccm, so daß von einer Mikromethode im eigentlichen Sinne hier kaum gesprochen werden kann. Während R. Müller sich bei der Untersuchung der Sera mit 1 Tropfen begnügt, was einer etwa 10 proz. Konzentration bei unserer Versuchsanordnung entspricht, nimmt er vom Liquor das 4—8fache, also 4 bis 8 Tropfen, wodurch die Methodik den Charakter einer Mikromethode vollends verliert, wenn man berücksichtigt, daß man die gleiche Tropfenzahl für das Kontrollglas verbraucht.

5. Eigene Tropfmethode.

Alle Reagenzien werden in der Menge von 1 Tropfen eingestellt. Zu 1 Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit wird je ein Tropfen der geeigneten Extrakt- und Komplementverdünnung gebracht, wobei auf die geringere Tropfengröße der alkoholischen Extrakte Rücksicht zu nehmen ist (s. S. 375). Nach Verweilen der Gläser im Brutschrank während einer Stunde erfolgt der Zusatz von 2 Tropfen des Gemisches von Hammelblutkörperchen und hämolytischem Serum. Die Extrakt-, Serum- bzw. Liquor-, sowie die Systemkontrollen werden gleichfalls mit Tropfen angestellt.

Im Hinblick auf die geringe Flüssigkeitsmenge — 5 Tropfen Gesamtvolumen — muß die Verdunstung im Brutschrank möglichst niedergehalten werden. Um dies zu erreichen, ist die Verwendung enger Reagensgläser (von 6—8 mm lichter Weite) wünschenswert. Die Oberfläche der Flüssigkeit ist dabei eine so beschränkte, daß die Verdunstung den Ablauf des Versuchs nicht beeinträchtigt. Der Aufenthalt der Gläser im Brutschrank darf allerdings nicht unnötig verlängert werden. Nach Zusatz des Blutes ist die Hämolyse im allgemeinen nach einer halben Stunde so weit vorgeschritten, daß man den Versuch herausnehmen und die Resultate notieren kann. Die gesamte Dauer der Brutschrankeinwirkung beträgt dann nicht mehr als $1\frac{1}{2}$ Stunden. Verkorken der Gläser scheint mir entbehrlich zu sein. Auf die Benutzung mehrerer Extrakte wird man im allgemeinen verzichten müssen, denn jeder weitere Extrakt verlangt einen weiteren Tropfen Liquor oder Kammerwasser. Ein einziger gut ausgeprobter Extrakt genügt im Notfall bei kritischer Beurteilung völlig zur Gewinnung eines zuverlässigen Resultates. Einstellung reichlicher Kontrollen von Seris und Spinalflüssigkeiten von bekannter Reaktionsweise ist erforderlich. Um bezüglich der Wertigkeit des jeweiligen Mikroversuches sich noch weiter zu sichern, ist anzuraten, die Kontrollsera und Kontrollspinalflüssigkeiten gleichzeitig im Mikroversuch und im Versuch mit großen Mengen mitzuführen.

Übereinstimmung der beiden Kontrollreihen erlaubt dann jeden etwa noch bestehenden Zweifel an der Brauchbarkeit der Mikroreaktionen auszuschließen.

Untersuchung von Serum.

Man stellt aus einem Tropfen Serum die benötigte 20 proz. Serumverdünnung durch Zusatz von 4 Tropfen Kochsalzlösung her. In das Versuchsglas für die Serumkontrolle wird je 1 Tropfen gebraucht. Es bleiben somit 3 Tropfen übrig. Man hätte also genügend Material, um mit größeren Mengen den Versuch anzustellen — 2 Tropfen für das Versuchsglas und 2—3 Tropfen für die Serumkontrolle. Dies ist jedoch nicht angängig, wenn man die Stärke der Serumreaktion mit der des zugehörigen Liquors oder Kammerwasser vergleichen will und die Versuche mit diesen Körperflüssigkeiten auf Tropfeneinheit einstellt.

Untersuchung von Liquor und Kammerwasser.

Hat man nur 1 Tropfen zur Verfügung, so gibt man diesen unverdünnt in das Versuchsglas. Man führt bei diesem Vorgehen die Reaktion mit 100 proz. Liquor aus, entsprechend 1 ccm Liquor bei 5 ccm Gesamtvolumen. In diesem Falle muß man auf die Liquorkontrolle, die gleichfalls 1 Tropfen verlangen würde, verzichten. Negativer Ausfall der Reaktion ist unter diesen Umständen verwertbar, positiver nicht. Steht ein zweiter Tropfen zur Verfügung, so verwendet man diesen für die Liquorkontrolle.

Glaubt man sich mit der Festsetzung begnügen zu können, wie der 50 proz. Liquor sich der WaR. gegenüber verhält, so ist dies einschließlich der Liquorkontrolle mit 1 Tropfen Liquor zu erreichen. Man versetzt den Liquortropfen mit einem Tropfen Kochsalzlösung und verwendet einen Tropfen dieser Verdünnung für das Versuchsglas den anderen für die Liquorkontrolle. Man erhält so ein Resultat, das dem mit 0,5 ccm bei dem großen Versuch entspricht.

Sind 3 Tropfen Liquor vorhanden, so kann man auch eine Untersuchung des Liquors in einer geringeren Konzentration vornehmen. Man verdünnt je nach dem gewünschten Verdünnungsgrad einen Tropfen Liquor mit der nötigen Anzahl von Tropfen Kochsalzlösung und benutzt jeweils 1 Tropfen der Verdünnung.

Hierbei entspricht:

1 Tr. der Verdünnung	1 Liquor	+ 4 NaCl-Lösung	...	0,2 ccm des großen Versuchs.
1 „ „ „	1 „	+ 3 „ „	...	0,25 „ „ „
1 „ „ „	1 „	+ 2 „ „	...	0,33 „ „ „

Für die Untersuchung des Kammerwassers gelten die gleichen Vorschriften.

Sachs-Georgische Reaktion.

Die für die Sachs-Georgische Reaktion hinsichtlich der Serumuntersuchungen angegebenen Mikromethoden lassen sich im Prinzip auch für den Liquor und das Kammerwasser verwenden. Hat man so wenig Material zur Verfügung, daß es für die gleichzeitige Anstellung der WaR. und der S.-G.-R. nicht ausreicht, so wird man sich auf die WaR. beschränken, die ja im Liquor und wohl auch im Kammerwasser intensivere Ausschläge gibt; mit Spinalflüssigkeiten, die nach Wassermann negativ reagieren, jedoch positive S.-G.-R. geben, ist wohl kaum zu rechnen, während das Umgekehrte nicht selten ist. Das Arbeiten mit kleinen Mengen ist bei der S.-G.-R. dadurch erschwert, daß hier ein 24stündiger Brutschrankaufenthalt erwünscht ist und deshalb besondere Maßnahmen angewandt werden müssen, um die Verdunstung der Flüssigkeit zu verhindern.

Nachfolgende Mikromethoden für Sera sind bisher empfohlen worden:

Mikromethode nach Scheer¹⁾.

Zum Abmessen dient eine Zeißsche Leukocytenpipette. Ein Teilstrich der Pipette inaktiviertes Serum, 9 Teilstriche 0,85proz. Kochsalzlösung und 5 Teilstriche des nach der Vorschrift von Sachs und Georgi verdünnten Extraktes werden in einem Blockschälchen gemischt. Man verwendet am besten Widalschälchen, von denen sechs in einem Glasblock vereinigt sind. Zweckmäßig gibt man erst 9 Teilstriche Kochsalzlösung in das Schälchen, dann 1 Teilstrich Serum und 5 des Extraktes. Dann wird der ganze Tropfen im Schälchen mit einem Glasstab umgerührt und das Schälchen mit einer gut eingefetteten Glasscheibe so verschlossen, daß der Deckel absolut luftdicht abschließt, damit der Inhalt nicht eintrocknet. Die Schälchen bleiben 2 Stunden im Brutschrank und werden dann für die nächsten zwei Stunden im warmen Raum oder auf dem Brutschrank gehalten, damit sie nicht abkühlen. Sie werden dann mit Hilfe einer Lupe gegen dunklen Hintergrund, z. B. den Fußboden abgelesen.

2. Mikromethode nach Lipp²⁾.

Mit einer Tropfpipette werden 1 Tropfen Serum, 9 Tropfen Kochsalzlösung und 5 Tropfen Extraktverdünnung zusammengegeben. Die Mischung wird in Reagensgläsern von 1 cm Durchmesser oder in Uhrschälchen, die mit eingefetteten Glasplatten zu verschließen sind, gegeben. Die Ablesung erfolgt mit der Lupe oder mit dem Mikroskop, von dessen schwächstem Objektiv die Frontlinse abgeschraubt wird.

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 47 und 1920, Nr. 32.

²⁾ Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 42.

3. Mikromethode nach Kafka¹⁾.

In kleine Tröglehen von 5 mm Seitenhöhe, wie sie von der Firma Karl Zeiss für das Vergleichsspektroskop verwendet werden, werden mit Hilfe einer Haarpipette 8 Tropfen 0,9proz. Kochsalzlösung eingefüllt. Dann folgen 2 Tropfen Serum, hierauf 5 Tropfen der Extraktverdünnung; ist dann das Tröglehen nicht vollkommen gefüllt, dann kann ein weiterer Tropfen Kochsalzlösung diesem nachhelfen. Nun wird mit einem Deckglas verschlossen. Das Einfetten mit seiner Gefahr der Verunreinigung wird so vermieden. Beobachtung mit Lupe gegen dunklen Untergrund. Um eine vollkommene exakte Methode zu haben, hat Kafka zählkammerähnliche Glasapparate machen lassen, deren Rauminhalt gerade der Anzahl von 15 Tropfen entspricht. Nach Füllung Verschuß mit Deckglas.

Modifikation für die Untersuchung von Liquor und Kammerwasser.

Könnte man sich damit begnügen, den Liquor mit Kochsalzlösung in der entsprechenden Verdünnung wie das Serum zu untersuchen = 10%, wie es Scheer und Lipp, 20% wie es Kafka für die Mikromethodik in Vorschlag bringen, so würde man mit relativ kleinen Mengen Liquor auskommen — mit dem Bruchteil eines Tropfens nach Scheer, mit 2 Tropfen (davon 1 Tropfen für die Kontrolle) nach Lipp, mit 4 Tropfen (2 Tropfen für die Kontrolle) nach Kafka. Es ist jedoch durchaus notwendig, den Liquor in höherer Konzentration, am besten unverdünnt zu prüfen, da vielfach erst dann Ausflockungen zu erzielen sind. Hierfür sind die Versuchsanordnungen von Lipp und von Kafka zu verschwenderisch, sie würden 20 Tropfen Liquor beanspruchen (10 für das Versuchsglas und 10 für die Kontrolle). Geht man nach Scheer vor, so kann man auch bei Verwendung 100proz. Liquors mit ziemlich wenig Material auskommen. Man hätte 10 Teilstriche der Leukocytenmischpipette zu 5 Teilstrichen Extraktverdünnung zu geben. Das wäre etwa 1 Tropfen Liquor, so daß mit der gleichen Menge für die Liquorkontrolle der Gesamtverbrauch etwa 2 Tropfen betragen würde. Zieht man eine Tropfmethode vor, so würde das Verhältnis 2 Tropfen Liquor zu 1 Tropfen Extraktverdünnung (Berücksichtigung der Tropfengröße! s. S. 375) für die Untersuchung des unverdünnten Liquors betragen. Unter Hinzurechnung von 2 weiteren Tropfen für die Kontrolle käme man mit 4 Tropfen aus. Die Herstellung von zählkammerartigen Apparaten nach dem Vorschlage Kafkas würde auch für eine derartig geringe Tropfenzahl leicht möglich sein. Kammerwasser ist entsprechend zu behandeln.

Noch einfacher scheint es mir zu sein, das Gemisch in kleine Glasröhrchen, ähnlich denen, die Wright für die Serumgewinnung zum

¹⁾ Dermatol. Wochenschr. 1920, Nr. 25.

Zwecke der Phagocytoseversuche eingeführt hat, aufzunehmen und die Gläser zuzuschmelzen. Solche Gläser gestatten im Gegensatz zu den Schälchen die Untersuchung im Agglutinoskop. Läßt man die Reaktion sich in Gefäßen vollziehen, welche nicht in das Agglutinoskop passen, z. B. in Schälchen, so kann man zum Ablesen der Resultate die Flüssigkeit nach dem Aufschütteln in Capillare aufsteigen lassen und diese in das Agglutinoskop einschieben, wodurch eine sehr scharfe Beobachtung ermöglicht wird.

Zusammenfassende Anweisungen für die Mikromethodik.

Überlegen wir, wie geringe Mengen von Liquor und Kammerwasser sich am besten verwerten lassen, so kommen wir zu folgenden Vorschlägen, die sich natürlich nach Bedarf variieren lassen.

a) Bei 1 Tropfen Material: Zellzählung in der Kammer: ungefärbt oder gefärbt mit Verwendung von auf dem Boden der Kammer eingetrocknetem Farbstoff. Nonnes Phase I in der Capillare. Pandysche Carbol-säureprobe, anzustellen mit 1 Öse Untersuchungsflüssigkeit. Man bringt hierbei am besten den ganzen Tropfen auf die Kammer, entnimmt dann 1 Capillare Portion und 1 Öse und benutzt den Rest für die Zellzählung.

b) Bei 2 Tropfen Material: 1 Tropfen wie bei a. 2 Tropfen für die WaR. mit 100 proz. Liquor unter Weglassung der Liquorkontrolle oder mit 50 proz. Liquor nebst Liquorkontrolle. Steht die Ermittlung der WaR. im unverdünnten Liquor im Vordergrund, so ist die WaR. mit Liquorkontrolle also unter Benutzung beider Tropfen auszuführen.

c) Bei 3 Tropfen Material: 1. Tropfen wie bei a), 2. und 3. Tropfen für die WaR.

d) Bei 4 Tropfen Material: Zellzählung unter Benutzung der Leukocytenmischpipette. Im übrigen wie bei c.

e) Bei 5 Tropfen Material: Wie bei d), dazu α Goldsolreaktion (1 Tropfen) oder β Stichprobe für die Bestimmung des Gesamteiweißes nach Bisgaard (1 Tropfen).

f) Bei 6 Tropfen Material: Wie bei d), dazu e) α und e) β oder anstatt beider Reaktionen γ) genaue Bestimmung des Gesamteiweißes, Salpetersäure-Schichtprobe, Verdünnungsreihen (2 Tropfen).

g) Bei 7 Tropfen Material: Wie bei d), dazu e) α und f) γ .

h) Bei 8 Tropfen Material: Wie bei g), dazu Mastixreaktion, Originalmethode Emanuels (1 Tropfen) oder b-Kurve nach Jacobsthal und Kafka (1 Tropfen).

i) Bei 9 Tropfen Material: Wie bei g), dazu δ Mastixreaktion, a- und b-Kurve.

k) Bei 13 Tropfen Material: Wie bei i), dazu Sachs-Georgische Reaktion (4 Tropfen).

l) Bei 15 Tropfen Material: Wie bei k), dazu Weichbrodts Sublimatprobe (2 Tropfen).