

Ber. nat.-med. Ver. Innsbruck	Band 56 Festschr. Steinböck	S. 421—425	Innsbruck, Dez. 1968
-------------------------------	--------------------------------	------------	----------------------

Die Kombination von Färbetechnik und Phasenkontrastmikroskopie zum erleichterten Auszählen von Vogelblutkörperchen in der Zählkammer

von

Ines Maria KOCH

The Combination of Staining Technique and Phase Contrast Microscopy for the Counting of Bird Blood Corpuscles in the Counting Chamber.

Synopsis: A combination of two methods is described, providing advantages if blood corpuscles of birds have to be counted: The blood is diluted with a reagent based on the GIEMSA standard solution, is put *lege artis* into the counting chamber after 24 hours and microscoped with the phase contrast equipment of ZERNIKE (REICHERT, Vienna).

Memory of the twentieth anniversary of Gustav GIEMSA's death.

Die Differentialdiagnose der geformten Elemente im Vogelblut bereitet beträchtliche Schwierigkeiten, wenn man nur ungefärbtes Material auswerten kann, von der Art etwa, wie es in die Zählkammern eingebracht werden muß. Denn bei den Gefiederten sind Erythrozyten und Thrombozyten kernhaltige Zellen, zudem ähnlich in Form und Größe; die nicht granulierten Leukozyten, besonders die großen Lymphozyten und Monozyten, imponieren aber auch durch ihren gut ausgebildeten Kern, so daß sich, bei nicht optimalen Untersuchungsbedingungen, die Unterschiede verwischen können und daher diagnostische Verwechslungen sehr leicht möglich werden.

Als ein Beispiel seien die Durchschnittsmasse der Hühnerblutkörperchen nach Lucas angegeben (LUCAS u. JAMROZ 1961):

Erythrozyten: 12,3 μ zu 6,9 μ
Thrombozyten: 8,8 μ zu 5,0 μ
Monozyten: 12,1 μ als Durchmesser.

Auf der Suche nach methodischer Hilfe zur Überwindung dieser Fehlerquellen wurde ich durch die wertvolle und zu herzlichem Dank verpflichtende Beratung von L. BÜHLMANN, (Vet. Physiol. Institut der Universität Zürich; Vorstand: Prof. Dr. H. SPÖRRI) auf die Arbeit von S. E. SADEK (1955) aufmerksam gemacht. Auch er erwähnt mögliche Fehldiagnosen und schreibt darüber Folgendes: „Das Zählen von

Vogel-Erythrozyten bereitet nur wenig Schwierigkeiten. Die Vogel-Leukozyten jedoch präsentieren dabei Probleme, die man bei den Säuger-Leukozyten nicht antrifft. Da die Vogel-Erythrozyten kernhaltig sind, machen es diese Kerne unmöglich, sie von den Leukozyten zu unterscheiden, wenn man dieselben Standardmethoden verwendet, die man beim Zählen der weißen Blutkörperchen der Säugetiere gebraucht. . . DE VILLIERS und andere stellten fest, daß es schwierig sei, mit Sicherheit Vogel-Thrombozyten und kleine Lymphozyten mit der Vergrößerung, die man in Verbindung mit der Zählkammer verwendet, zu unterscheiden. . . Die vorliegende Arbeit beschreibt nun eine Lösung, die Erythrozyten und Leukozyten verschieden färbt, um damit Vogelblut direkt auszuzählen. . . Eine einfache Lösung für Vogelblut wird aus den angegebenen Materialien hergestellt:

GIEMSA-Standardlösung	10 ml
Neutrales Formalin	5 ml
Isotone 0,85%ige NaCl-Lösung	85 ml

. . . Der (Erythrozyten-)Melangeur wird verwendet, um rote und weiße Blutkörperchen zu zählen. Die Pipette wird bis zur Marke 0,5 mit Blut gefüllt und dann wird bis zum Zeichen 101 die Farblösung nachgesaugt. Damit erhält man eine Verdünnung 1:200. Um Blut und Farblösung zu mischen, soll der Melangeur kräftig geschüttelt werden. Nach Anbringen eines Gummibandes über die Öffnungen der Mischpipette legt man sie über Nacht in den Kühlschrank, um die maximale Färbe-reaktion zu erreichen. Die Zählung erfolgt gleich wie beim Säugerblut.”

Diese SADEKsche Lösung bewährt sich ausgezeichnet. Vor allem ist ihr Formalin-gehalt sehr wertvoll; vergrößert sich doch dadurch der zeitliche Spielraum für einen Allein-Untersucher beträchtlich.

Die von SADEK an anderer Stelle empfohlene „Brightline-Zählkammer“ konnte ich leider nicht zeitgerecht bekommen, so daß ich mit einer der allgemein in der Humanmedizin verwendeten Zählkammern (BÜRKER-TÜRK-Kammer) das Auslangen finden mußte. Für vereinzelte und seltene Prüfungen läßt sich damit bei der üblichen Mikroskop-Beleuchtung mit grünem oder grauem Filter ganz erträglich arbeiten. Sind aber wiederholt größere Serien zu prüfen, ist diese Art des Mikroskopierens für die Augen des Untersuchers äußerst anstrengend und belastend. Aus Unzufriedenheit über diese ermüdende Arbeitsweise suchte ich nach einer Erleichterung und fand schließlich die entscheidende Hilfe im Phasenkontrastverfahren nach ZERNIKE (Mikroskop und Optik der Fa. REICHERT, Wien).

Da die SADEKsche Lösung, wenn sie sorgfältig bereitet und verarbeitet wird, die geformten Elemente des Blutes nicht knallig bunt anfärbt, ist die Verwendung des Phasenkontrastverfahrens nach ZERNIKE beim Mikroskopieren geradezu ideal, denn damit sieht man die nur zart tingierten Zellen zusätzlich eben auch noch „plastisch“. Man kombiniert also auf diese Weise die Vorteile zweier Methoden und wird dadurch in der Differentialdiagnose sicherer, was ja Zweck und Ziel ist.

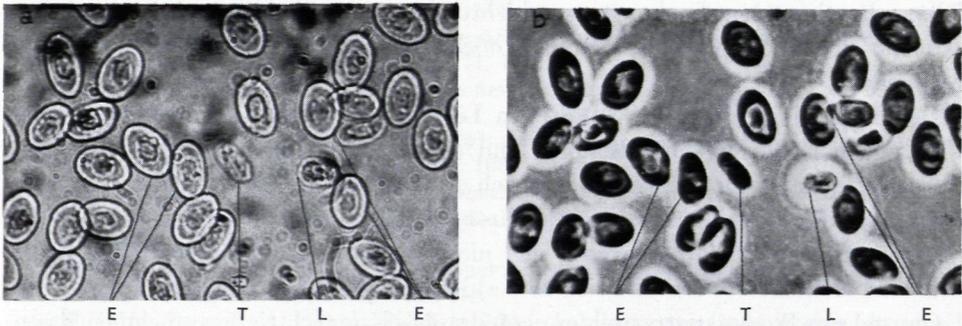


Abb. 1: Hühnerblut, verdünnt und gefärbt mit der von SADEK beschriebenen Mischung aus GIEMSA-Standardlösung, Formalin und isotoner NaCl-Lösung.
a: Mikrophotographie ohne Phasenkontrast,
b: Mikrophotographie mit Phasenkontrast n. ZERNIKE.
E = Erythrozyten, T = Thrombozyt, L = Leukozyt.

Wie schon SADEK sagt, geben uns die Erythrozyten weniger Rätsel auf, Schwierigkeiten bringen hauptsächlich die Thrombozyten und Leukozyten. Aber mit Hilfe der beschriebenen, nur leichten Färbung zeigen die Thrombozyten oder Spindelzellen die diagnostisch so wichtigen, leuchtend rotvioletten oder blauen Pünktchen im Protoplasma sehr gut, während sich der Kern durch den Phasenkontrast sehr plastisch vom kaum sichtbaren Protoplasma abhebt. Der Umriß der Zelle ist durch die deutlich erkennbare Membran gut auszunehmen.

Die Leukoenkozyten dagegen haben runde Zelleiber und sind damit auch charakteristisch in ihrer Form. Man kann sogar die Granula der sogenannten „Pseudoeosinophilen“ aufleuchten sehen. So wird es möglich, mit einer einzigen Zählkammer-

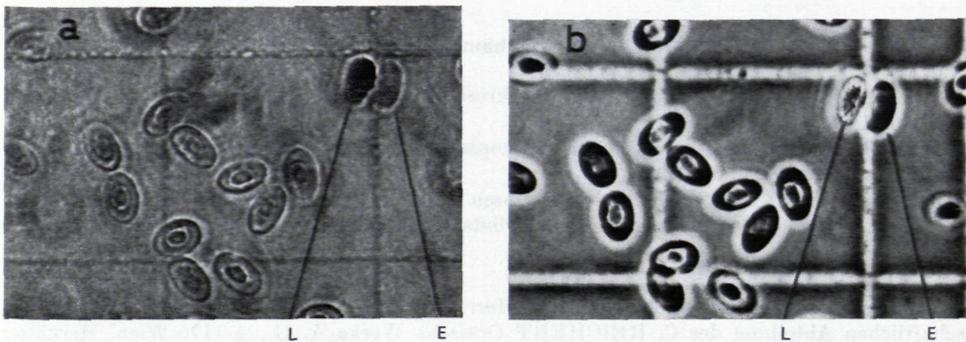


Abb. 2: Hühnerblut, verdünnt und gefärbt wie beschrieben, in der Zählkammer.
a: Mikrophotographie ohne Phasenkontrast,
b: Mikrophotographie mit Phasenkontrast.
L = (pseudoeosinophiler) Leukozyt, E = Erythrozyt.

füllung Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zu zählen; zeitlich besonders ökonomisch wird diese Arbeit, wenn man noch zusätzlich mechanische Zählmaschinen verwendet.

Der Formalingehalt der SADEKschen Lösung ermöglicht es zudem, auch noch 48 Stunden nach der Blutentnahme, und später, eine Kontrollzählung der roten Blutkörperchen durchzuführen, so daß sich der Untersucher selbst überprüfen kann. Dabei sind die Ergebnisse bei den Erythrozytenzählungen zufriedenstellend; Werte für Leukozyten und Thrombozyten sind nicht mehr zu ermitteln, weil diese Zellen sehr bald Häufchen bilden und sich so verklumpen.

Obwohl sich Phasenkontrastbilder photographisch nur schwierig aufnehmen lassen, zeigen die beigegebenen Mikrophotos (Abb. 1 und 2)¹ deutlich, daß sich dieses Kombinationsverfahren als diagnostische Hilfe wirklich glänzend bewährt.

Gedenken

Am 10. Juni 1968 jährte sich zum 20. Male der Todestag von Gustav GIEMSA. Es ist angebracht, hier seiner in Dankbarkeit und Bewunderung für seine wissenschaftliche Leistung zu gedenken. GIEMSA, ein Mitarbeiter von Robert KOCH, verbrachte seine letzten Lebensjahre in Tirol. Nachdem ich die Ehre gehabt hatte, ihn persönlich kennen zu lernen, war es mir eine besondere Freude, die „GIEMSA-Standardlösung“ in einem ganz modernen Färbeverfahren anzutreffen und in der eigenen Untersuchungstechnik erfolgreich zu nutzen.

Zitierte Literatur:

- LUCAS, A. M. und C. JAMROZ (1961): Atlas of Avian Hematology. Agriculture Monography 25. U. S. Dept. Agriculture, Washington, 1—271.
SADEK, S. E. (1955): A simple Technique for counting avian blood cells. J. of the Am. Vet. med. Assoc. 127: 72.

Weitere Literatur zur hämatologischen Methodik

- BARGMANN, W. (1967): Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1—784.
BUCHER, O. (1962): Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 3. Aufl., Huber, Bern und Stuttgart, 1—652.
HENN, O. (1960): Der Einfluß kleiner Dosen Radium-Emanation auf das hämopoetische System und die Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse der weißen Maus. Ztschr. für Biologie 111: 393.

¹ Die Mikroaufnahmen photographierte Herr Dipl.-Ing. O. RÜKER, Leiter der wissenschaftlichen Abteilung der C. REICHERT Optische Werke A. G., A-1170 Wien, Hernalser Hauptstraße 219. Ich bin ihm und dem Hause dafür zu größtem Dank verpflichtet. Die Bilder wurden am REICHERT-Forschungsmikroskop ‚Zetopan‘ mit Halogen-Niedervoltlampe 100 Watt, Achromat 63/0,80 für die Hellfeldaufnahmen, Phasenkontrast-Achromat Ph 63/0,80 für die Phasenkontrastaufnahmen, mit REICHERT-Photoautomatic und Grünfilter aufgenommen.

- HENN, O. (1959): Über die langdauernde Einwirkung kleinster Dosen Radiumemanation auf das haemopoetische System von Versuchstieren. Sitzungsberichte der Österr. Akademie d. Wissenschaften, Math.-nat. Kl. Abt. II, **168**: 51.
- HITTMAIR, A. (1946): Blutdiagnostik für den praktischen Arzt. 5. Aufl., Urban und Schwarzenberg, Wien, 1–133.
- KIRCHMAIR, H. (1950): Die Giemsa-Färbung. In: Forschungen und Forscher der Tiroler Ärzteschule. Innsbruck, **2** (1948–1950): 106–131.
- ROMEIS, B. (1948): Mikroskopische Technik, 15. Aufl., Oldenbourg, München, 1–696.
- RÜMKE, C. L. (1960): Variabilität der Ergebnisse von Blutausstrichdifferenzierungen. Triangel **4**: 154–158.
- SCHERMER, S. (1958): Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. 2. Aufl., Barth, Leipzig, —. Kapitel: Das Huhn 135–155.
- SCHULZE, E. und H. GRAUPNER, (1960): Anleitung zum mikroskopisch-technischen Arbeiten in Biologie und Medizin. 2. Aufl., Geest und Portig K. G., Leipzig, 1–191.
- v. SCHUMACHER, S. (1959): Grundriß der Histologie des Menschen. Herausgegeben von G. SAUSER, 8. Aufl., Selbstverlag, Innsbruck, 1–242.
- UNDRITZ, E. (1944): Über Leukozytenforschung, reaktive und erbliche Besonderheiten der Leukozytenkerne. Schweiz. Med. Wschr. **74**: 995–1018.
- UNDRITZ, E. (1959): Herstellung von Blut- und Knochenmarksausstrichen. Triangel **4**: 36–40.
- UNDRITZ, E. und E. ROTHLIN, (1952): Hämatologische Tafeln Sandoz. Sandoz A. G., Basel, 1–75, 44 Tafeln.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck](#)

Jahr/Year: 1968

Band/Volume: [56](#)

Autor(en)/Author(s): Koch Ines Maria

Artikel/Article: [Die Kombination von Färbetechnik und Phasenkontrastmikroskopie zum erleichterten Auszählen von Vogelblutkörperchen in der Zählkammer. 421-425](#)