

Thomas Binder*, Heinz Diem, Roland Fuchs, Kai Gutensohn and Thomas Nebe für den Arbeitskreis Laboratorium der DGHO

***Pappenheim*-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen**

Pappenheim Stain: Description of a hematological standard stain – history, chemistry, procedure, artifacts and problem solutions

Zusammenfassung: Vor genau 100 Jahren hat *Artur Pappenheim* die endgültige Fassung seiner „panoptischen Universalfärbung für Bluttrockenpräparate“ veröffentlicht, in der die *Jenner*-Färbung bzw. *May-Grünwald*-Färbung mit der *Giemsa*-Färbung kombiniert wird. Seine seither als *Pappenheim*-Färbung bzw. *May-Grünwald-Giemsa*-Färbung bekannte Vorschrift bewirkt eine kräftige und zuverlässige Anfärbung der Details von Kern und Zytoplasma mit besonders guter Darstellung der Granula. Die *Pappenheim*-Färbung wird weltweit in diversen Modifikationen mit entsprechend schwankender Färbequalität verwendet, die mit aktuellem Qualitätsmanagement nicht kompatibel ist. Artikel über die Qualitätskontrolle hämatologischer Standardfärbungen wurden bisher nicht veröffentlicht. Der *Arbeitskreis Laboratorium der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie* veröffentlicht deshalb diesen erprobten „Standard für die *Pappenheim*-Färbung“. Mit dieser Standard-Prozedur gelingt eine Färbung, die in allen Laboratorien zytologische Präparate von Körperflüssigkeiten und Gewebepreparaten identisch und mit hoher Präzision anfärbt. Das Ergebnis entspricht der von *Pappenheim* verbal und in Bildern beschriebenen Anfärbung. Das Protokoll beschreibt die Präanalytik, den Prozess der Färbung in Küvetten und die Qualitätskontrolle. Dieses Standard-Protokoll ist auch für die Anfertigung von Präparaten für das Qualitätsmanagement (z.B. Ringversuche) anwendbar, wenn das Färbeergebnis visuell und kolorimetrisch überprüft wird. Mit Ausstrich- und Farbe-Vollautomaten wird mit einem ähnlichen Färbeprotokoll ein übereinstimmendes Färbeergebnis erreicht; die Färbung auf der Färbebank wurde nicht untersucht. Wir berichten über erste kolorimetrische Untersuchungen an korrekt und inkorrekt ausgeführten *Pappenheim*-Färbungen und beschreiben die

korrekte Färbung nicht nur visuell, sondern auch anhand kolorimetrischer Daten.

Schlüsselwörter: Blutbild; Färbungen; Knochenmark; *May-Grünwald-Giemsa*; Organzytologie; *Pappenheim*; Qualitätsmanagement; Standardprotokoll.

Abstract: Exactly 100 years ago, *Artur Pappenheim* published the final version of his staining procedure for blood smears (“panoptische Universalfärbung für Bluttrockenpräparate”), in which he combined the *Jenner* stain and the *May-Grünwald* stain with the *Giemsa* stain. Since then, this stain has been referred to as *Pappenheim* stain or *May-Grünwald-Giemsa* stain. It provides a strong and reliable staining of the details of nuclei and cytoplasm, with prominent depiction of their granules. *Pappenheim*'s stain is used worldwide with various modifications, which lead to inconsistencies in staining results that are not compatible with modern quality standards. There are no reports on quality assurance of hematological stains in the literature. Therefore, the task force *Laboratorium of the German Society of Hematology and Oncology* publishes this “Standard Procedure for the *Pappenheim*-Stain”. This standard stain reliably produces inter-laboratory identical results in all cytological specimens of body fluids as well as tissue. The staining results parallel those published by *Pappenheim* in words and images. This standard procedure describes pre-analytical aspects, the staining in jars, and has associated quality assurance issues. Using a similar protocol, automated smear preparation and staining machines produce an identical staining result. We did not investigate staining on racks. We report on preliminary colorimetric data of correct

and incorrect *Pappenheim* stains and describe correct staining using visual and colorimetric terms.

Keywords: blood differential; bone marrow; cytology; *May-Grünwald-Giemsa*; *Pappenheim*; quality assessment; staining; standard procedure.

*Korrespondenz: Dr. med. Thomas Binder, Labor für hämatologische Mikrofotografie, Buchenlandweg 211, 89075 Ulm, Deutschland, Tel.: +49 731 266959, Fax: +49 731 7051543, E-Mail: thomas.rh.binder@googlemail.com

Heinz Diem: Würmtallabor, München-Gauting, Deutschland

Roland Fuchs: Medizinische Klinik IV der Universität, Aachen, Deutschland

Kai Gutensohn: Institut für Transfusionsmedizin der Universität, Hamburg, Deutschland

Thomas Nebe: Onkologikum, Speziallabor für Hämatologie und Onkologie, Kaiserslautern, Deutschland

Einleitung

Die *Pappenheim*-Färbung ist eine *panoptische* Färbung aus der Gruppe der sog. *Romanowsky-Giemsa*-Färbungen, die Zytoplasmata, Granula und Zellkerne detailliert und unterschiedlich gefärbt darstellt („Polychromie“). Sie ist unter dem Namen *May-Grünwald-Giemsa* in Europa die Standardfärbung für hämatologisch-zytologische Präparate. Im englischen Sprachraum ist die ähnliche *Wright*-Färbung bzw. *Wright-Giemsa*-Färbung verbreitet. Diese Färbungen werden auch in der Organzytologie als Standardfärbung verwandt (neben der *Papanicolaou*-Färbung) [1].

Die modernen Blutfärbungen gehen auf *Paul Ehrlich* zurück, der die Anilinfarbstoffe in basische und saure Farbstoffe unterteilte und sie 1877 als erster auf die Färbung von Blutbildern anwandte [2, 3]. Nach Entdeckung des Malaria-Parasiten durch *C.L.A. Laveran* 1880 [4] hat *C. Chenzinsky* 1888 als erster eine Malaria-Färbung publiziert [5]. Verbesserungen der Färbung mit Methylenblau und Eosin haben 1890 *F. Plehn* [6], 1891 *E. Malachowky* [7] sowie 1891 *D.L. Romanowsky* [8] unabhängig voneinander beschrieben. 1898 haben *Bernhard Nocht* [9] und 1902 *Gustav Giemsa* [10] die jetzt nach *Romanowsky* benannte Färbung weiterentwickelt, ebenfalls zum Nachweis von Malaria-Parasiten.

Arthur Pappenheim hat 1912 [11] eine „panoptische Universalfärbung für Bluttrockenpräparate“ veröffentlicht, in der die Färbungen von *Louis Jenner* (1899 [12]) bzw. von *Richard May* und *Ludwig Grünwald* (1902 [13]) jeweils mit der *Giemsa*-Färbung kombiniert werden. Diese Vorschrift ist seitdem als *Pappenheim*-Färbung bzw. *May-Grünwald-Giemsa*-Färbung weltweit zu einem Standard geworden.

Zuletzt haben sich die Arbeitsgruppen von *Paul N. Marshall* 1981 [14] und *Dietrich H. Wittekind* 1983 [15] ausführlich mit den Grundlagen der „*Romanowsky-Giemsa*-Färbungen“ beschäftigt. Das *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH) hat 1984 das Protokoll von *Wittekind* als Standardmethode übernommen [16]. Diese Färbung mit den gereinigten Farbstoffen Azur B und Eosin Y, ohne Methylenblau, ergibt eine mit der *Pappenheim*-Färbung verwandte Anfärbung; sie hat sich aber nicht überall durchgesetzt, ebenso wenig wie die ähnlichen, von *Marshall* publizierten Färbungen mit reinem Azur B und Eosin Y (\pm Methylenblau) [14, 17].

Die *Pappenheim*-Färbung erlaubt eine sehr detaillierte Beschreibung der hämatopoetischen normalen und pathologischen Zellen und hat dadurch eine differenzierte, international standardisierte Nomenklatur ermöglicht. Die zytologische Untersuchung bildet die Grundlage der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes [18], insbesondere wird der Blastenanteil rein zytomorphologisch ermittelt. Eine Untersucher-unabhängige exakte Einordnung spezieller Zelltypen gelingt aber nur dann, wenn identisch gefärbte Präparate untersucht werden.

In Lehrbüchern und Färbearbeitungen der Hersteller der Färbelösungen sind sehr unterschiedliche und ungenaue Protokolle enthalten. Ein detaillierter Standard für die *Pappenheim*-Färbung mit Beschreibung der Präanalytik, der visuellen und objektiven Färberegebnisse und der Qualitätskontrolle ist bislang nicht publiziert.

Nur sehr wenige Artikel berichten über kolorimetrische Daten, zuletzt haben *Marshall* und *Galbraith* 1984 bis 1985 über die Farbspektren bei *Romanowsky-Giemsa*-gefärbten Präparaten publiziert [19–22]. Arbeiten über die klinische Qualitätskontrolle solcher Färbungen sind bislang nicht erschienen, weder mit visuellen noch mit quantitativen Analysen. Lediglich *Horobin* beschreibt 2011 Hinweise auf eventuell notwendige Modifikationen der Färbung bei Auftreten bestimmter visuell erfasster Phänomene [23].

Die globale wissenschaftliche Kommunikation morphologischer Daten, ins Internet gestellte Bildatlanten und die Qualitätsüberwachung z.B. durch Ringversuche erfordern ein allgemein akzeptiertes, zuverlässiges und detailliertes Färbeprotokoll. Deshalb veröffentlicht der *Arbeitskreis Laboratorium der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie* diesen „Standard für die *Pappenheim*-Färbung“.

Unser Protokoll basiert auf der 1912 von *Pappenheim* für Blutaussstriche publizierten Vorschrift, vgl. Abbildung 1. Im Gegensatz zum Original wird hier (a.) vor der Färbung mit Methanol fixiert anstelle von unverdünnter *May-Grünwald*-Lösung, wird (b.) in allen Färbeschritten nicht reines,

*Zur Blutzellfärbung im klinischen
Blutrockenpräparat und zur
histologischen Schnittpräparatfärbung der
hämatopoetischen Gewebe nach meinen
Methoden*

Von
A. Pappenheim

I.

Kombinierte May-Giemsa-Methode als panoptische
Universalfärbung für Blutrockenpräparate

.....

Demgegenüber lautet die moderne Vorschrift:

- . Fixieren in May- oder Jenner-Lösung 3 Minuten;
- . Zufügung von Aq. dest. (für Deckglaspräparate bis 20 Tropfen) und diese wässrige Mischflüssigkeit einwirken lassen 1 Minute.
- . Abgießen. (Nicht abspülen!)
- . Umfärben durch Einlegen oder Begießen mit verdünnter Giemsa-Lösung [15 Tr.! : 10 Aq. dest.], Optimum zwischen 12–14 Minuten. (Nicht unter 12, nicht über 15 Minuten).
- . Abwaschen, Trocknen. (Nicht über der Flamme!)

Diese Färbung ist absolut zuverlässig und gelingt jedem Anfänger. Vorzügliche Darstellung besonders auch der reifen Neutrophilie. Sie wird zurzeit in den Krankenhäusern der Charité ganz allgemein als die universelle Methode geübt.

.....

Färberischer Unterschied des Farbeffekts von reiner Giemsa-Färbung: Das Eosin wirkt stärker mit auch in den Leibern basophil lymphoider Zellen; die lymphoiden Zellplasmen erhalten dadurch einen leicht rötlichen Blau-Ton, geringste Spuren von Oxyphilie in ihnen treten besser hervor; die reifen ϵ -Granula der polynukleären Leukozyten und Myelozyten sind äußerst prägnant und präzise; die α -Granula stärker rot. Die Erythrozyten rein rosarot.

.....

Abbildung 1 Originalvorschrift von A. Pappenheim (Auszug).

sondern gepuffertes *aqua destillata* mit einem pH von 6,8 verwendet und wird (c.) sehr viel intensiver gefärbt und anschließend intensiv entfärbt (Pappenheim hat überwiegend *progressiv* ohne *Differenzierung* gefärbt). Durch diese Änderungen erreicht man (a.) eine konstante Farbtönung unabhängig vom jeweils verwendeten Wasser (*aqua dest.* bzw. *aqua demin.*), (b.) eine gleichmäßige Färbung auch in dickeren Präparaten und (c.) eine bessere Darstellung der Chromatinstruktur. Unser Protokoll ergibt dennoch die gleichen Farbtöne wie die Vorschrift von Pappenheim (durch Verwendung von Puffer (pH 6,8) und nicht ungepuffertem *aqua dest.* wie in Pappenheims Vorschrift (pH 7) entstehen wohl minimale Unterschiede).

Dieses Standardprotokoll enthält eine detaillierte Beschreibung aller Arbeitsschritte, des Färbergebnisses, der Färbefehler bzw. Artefakte, der Qualitätskontrolle und einige Referenzbilder. Es ist in spezialisierten Laboratorien und in Routinelaboratorien für hämatologische Präparate wie Blut, Liquor und Knochenmark und zudem für die Organzytologie anwendbar.

Eigene Daten visueller und kolorimetrischer Untersuchungen zeigen, dass (a.) nach diesem Protokoll gefärbte Präparate in allen Laboratorien immer gleich gefärbt, gut mit denen aus verwandten Färbungen (Giemsa, Wright, Wittekind/ICSH) vergleichbar und über Jahrzehnte hinaus haltbar sind, (b.) die Neueinführung dieses Standardprotokolls auch in Routine-Laboratorien problemlos gelingt und dass (c.) Ausstrich- und Färbvollautomaten mit einem entsprechenden Protokoll eine identische Färbung erreichen (Daten hier nicht dargestellt).

Visuelles Ergebnis der Pappenheim-Färbung

Die Pappenheim-Färbung wird zu Recht „panoptisch“ (*alles zeigend*) genannt. Sie bildet alle mikroskopischen Phänomene, die in der Routinediagnostik verwendet werden, kräftig und unterschiedlich gefärbt auf sauberem Hintergrund ab, so dass auch feine Abweichungen gut erkannt werden können. Spezialfärbungen sind lediglich für spezielle Fragestellungen erforderlich (z.B. Eisenfärbung, Peroxidase-Nachweis).

Zytoplasmata, Kerne, Erythrozyten und verschiedene Granula werden in Farbton, Sättigung und Helligkeit sehr unterschiedlich angefärbt. Manchmal ist zwar der Farbton zweier Details gleich, Helligkeit und Sättigung sind aber sehr unterschiedlich, so dass der Eindruck einer vollkommen anderen Farbe entsteht. Beispielsweise haben polychromatische Erythrozyten zwar etwa den Farbton von basophilen Zytoplasmata, sind aber sehr viel heller und weniger intensiv gefärbt; oder haben Erythrozyten und eosinophile Granula nahezu denselben Farbton, die eosinophilen Granula sind aber viel stärker gesättigt angefärbt.

Dieser stark differenzierende Effekt wird aber nur bei genauer Einhaltung des Protokolls erreicht; Modifikationen führen eventuell nicht nur zu einer generellen Verschiebung des Farbtons, sondern können bewirken, dass normalerweise stark unterschiedlich gefärbte Strukturen nicht mehr voneinander unterschieden werden können, oder dass Details nicht mehr dargestellt werden. Überdies weichen abnorm gefärbte Präparate vom seit 100 Jahren bekannten und akzeptierten „Farbideal“ ab.

Die charakteristische Anfärbung durch diese Färbung ist in vielen Lehrbüchern ausführlich beschrieben, Namen für Farben sind aber nicht eindeutig, deshalb sind fotografische Beispiele einer korrekten Pappenheim-Färbung in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

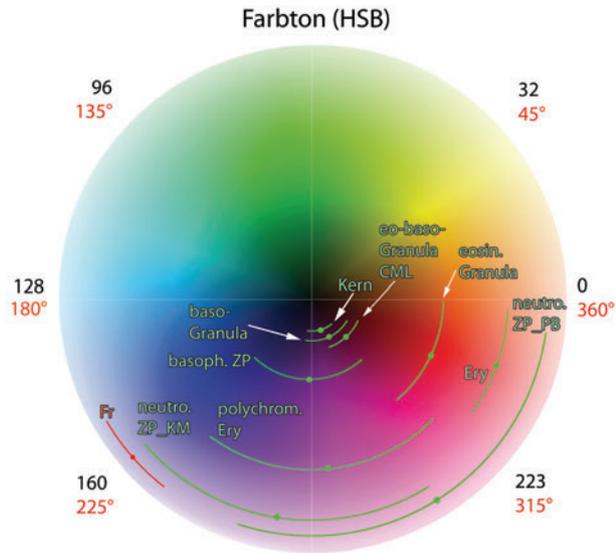


Abbildung 2 Visuelle Darstellung der Farbtöne im HSB-Farbkreis. Hue, Farbwinkel; Saturation, Frabsättigung; Brightness, Helligkeit. Korrekte Farben (grün markiert) von Erythrozyten (Ery), Kernen und Granula, neutrophilen Zytoplasmata (ZP) im peripheren Blut (PB) und im Knochenmark (KM); Erythrozyten-Farben einer fehlerhaften Färbung ("Fr", rot markiert).

Die Kreissegmente sind grafisch nicht exakt der Helligkeit bzw. Farbsättigung entsprechend abgebildet. Farbwinkel-Beschriftung entsprechend den beiden üblichen Konventionen im Bereich 0–360° (rot) bzw. 0–255 (schwarz) (numerisch); Bereiche angegeben als $\pm 2\sigma$, Mittelwert im Kreissegment mit Punkt markiert; Darstellung der Farbwerte dem mikroskopischen Eindruck entsprechend (nach Weißabgleich anhand einer *Leeraufnahme* entsprechend der Farbtemperatur der Mikroskopbeleuchtung).

Zur weiteren Objektivierung sind die Farbtöne der wichtigsten hämatologischen Details in Abbildung 2 in einen Farbkreis im HSB-Farbkreismodell eingetragen, bei dem der „Regenbogen“ der sichtbaren Farbtöne kreisförmig angeordnet ist ($H = \text{Hue} = \text{Farbton}$), die Farb-Intensität ($S = \text{Saturation} = \text{Sättigung}$) nimmt zum Zentrum hin zu, die Helligkeit ($B = \text{Brightness} = \text{Helligkeit}$) nimmt zum Zentrum hin ab. Diese Darstellung zeigt, wie gut die färberische Differenzierung der interessierenden Details ist, obwohl vor allem in der Hämatologie fast ausschließlich Rot-Blau-Töne vorkommen. In der Organzytologie kommen aber auch andere Farben vor wie grünlich gefärbtes verhorntes Zytoplasma oder schwarz dargestelltes Melanin.

Grundlage dieser Abbildung ist eine umfangreiche quantitative kolorimetrische Bild-Auswertung zahlreicher Fälle aus der Routine, aus Lehrsammlungen und aus Ringversuchen (Daten siehe Tabelle 1). Präparate, die mit diesem Protokoll von verschiedenen Laboratorien innerhalb der vergangenen 20 Jahre angefertigt

Detail	Farbwinkel		Farbwert	
	0–360°		0–255	
	von	bis	von	bis
Erythrozyten				
normal	325	357	230	253
polychromatisch	234	315	165	223
Heparin	320	350	226	247
Formaldehyd	250	330	177	234
alte Farblösungen	330	355	234	251
Paraproteinämie	320	350	226	247
falscher Puffer	210	232	149	165
Kerne				
normal	261	310	185	220
Heparin	245	255	173	181
Formaldehyd	240	260	170	184
alte Farblösungen	285	315	202	223
Paraproteinämie	270	305	191	216
falscher Puffer	262	290	186	206
Zytoplasmata				
basophiles ZP	225	313	159	221
neutrophiles ZP PB	253	352	179	249
neutrophiles ZP KM	221	302	157	214
Granula				
eosinophile Granula	311	359	220	254
eo-baso-Granula bei CML	290	335	205	237
basophile Granula	261	329	185	233

Tabelle 1 Kolorimetrisch ermittelte Farbtöne einiger zytologischer Details bei korrekter (**normal**) bzw. fehlerhafter Färbung. Die Bereiche der Farbwinkel bzw. Farbwerte sind als Mittelwerte $\pm 2\sigma$ angegeben, entsprechend den beiden üblichen Konventionen in Grad als Werte von 0–360° und numerisch von 0–255. Die kolorimetrische Ausmessung der Farbwerte erfolgte nach Weißabgleich im *Hintergrund* zwischen den Zellen, um den Farbbeitrag des Hintergrundes (v.a. des Blutplasmas) zu neutralisieren. Die Darstellung weicht von der Abbildung 2 ab, in der die Farben so dargestellt werden, wie sie im Mikroskop erscheinen (Beitrag des Hintergrundes bei korrekter Färbung etwa $+21^\circ/+15$). Die Werte können als Referenz für die Überprüfung der Färbequalität benutzt werden. CML, Chronische Myeloische Leukämie; KM, Knochenmark; PB, Peripheres Blut; ZP, Zytoplasma. Mittelwert normaler Erythrozyten: $341^\circ/242$, Modalwert $339^\circ/240$, Standardabweichung $8^\circ/6$. Mittelwert normaler Kerne: $286^\circ/202$, Modalwert $282^\circ/200$, Standardabweichung $13^\circ/9$; die Farbwerte der Kerne reifer Erythroblasten sind deutlich niedriger.

wurden, ergaben für Erythrozyten und Kerne identische Daten.

Normal gefärbte Erythrozyten bzw. Kerne belegen einen engen Farbumfang, unabhängig von der Intensität der Färbung. Zum Vergleich sind die Erythrozyten-Farbtöne eines Falls eingetragen, bei dem die Farbtöne durch Verwendung von ungepuffertem *aqua demin.* stark verschoben wurden.

Farbton, Sättigung und Helligkeit der neutrophilen Zytoplasmata von segmentkernigen Granulozyten (peripheres Blut) sind denen normaler oder polychromatischer Erythrozyten sehr ähnlich, sie unterscheiden sich nur gering vom Hintergrund; lediglich die neutrophilen Granula sind deutlich dunkler und stärker rot-blau angefärbt (im Bild sind die Farbtöne der neutrophilen Zytoplasmata und der neutrophilen Granula gemeinsam eingetragen).

Im Knochenmark ist das Zytoplasma ausreifender myeloischer Zellen (Metamyelozyten bis Stabkernige) deutlich stärker blau gefärbt, intensiver und dunkler als das der Segmentkernigen im peripheren Blut.

Basophiles ungranuliertes Zytoplasma (z.B. von Lymphozyten oder Blasten) besitzt zwar einen ähnlichen Farbton wie polychromatische Erythrozyten, etwas weniger rot, seine Farbe ist aber viel stärker gesättigt und ist viel dunkler.

Die Granula der myeloischen Zellen sind dunkel und intensiv gefärbt, je nach Typ dem Kern ähnlich (neutrophile Granula), etwas rötlicher (basophile Granula) oder weit davon entfernt im roten Bereich in der Nähe der Gelbtöne (eosinophile Granula).

Diese stark unterschiedliche Färbung („Polychromie“) der verschiedenen zellulären Details erklärt den hohen diagnostischen Stellenwert dieser mittlerweile 100 Jahre alten „differenzierenden panoptischen“ Färbung.

Die Färbung ist sehr zuverlässig (Präzision, Konstanz), belegt durch die Vergleichbarkeit der kolorimetrischen Ergebnisse über lange Zeiträume und über verschiedene Laboratorien hinweg. Die Präzision der Färbung ist quantitativ durch Bildanalyse überprüfbar.

Kolorimetrische Messungen und Statistik

Um Messwerte für den „Standard“-Farbton zu erhalten, der mit der Pappenheim-Färbung erzielt wird, wurden Fälle untersucht, die mit einem streng kontrollierten Protokoll gefärbt worden waren. Alle hierbei verwandten Protokolle benutzten dieselben Farbstoffe, primäre Fixation mit Methanol, gepuffertes Wasser mit einem pH von 6,8, die Färbung mit verdünnter May-Grünwald-Lösung, verdünnter Giemsa-Lösung und Entfärbung mit gepuffertem Wasser. Zahlreiche Ausstriche aus den hämatologischen Laboratorien der Universität Ulm, des Helios Klinikum Wuppertal, aus eigenen Lehrsammlungen und aus einigen kooperierenden Laboratorien wurden fotografiert und ausgewertet. Ein visueller Vergleich dieser

Fotografien mit der Farb-Beschreibung von A. Pappenheim und mit Bildatlanten ergab eine weitgehende Übereinstimmung.

Zusätzlich wurden 90 Fälle zwischen 2001 bis 2012 versandter Ringversuche des Differenzialblutbilds entsprechend untersucht. Darunter waren einige visuell als abnorm erkennbare Fälle mit entsprechend abweichenden Messwerten, ab dem Jahr 2008 kamen fast nur dem zuvor definierten Farbstandard entsprechende Fälle vor. Soweit zu eruieren war, lag den abweichenden Färbungen ein unkorrekter Puffer, die Verwendung ungepufferten Wassers oder eine um mehr als 2 Wochen verspätete Fixierung bzw. Färbung zugrunde.

Für die Messungen wurden hoch aufgelöste digitale Fotografien (kontrollierte Farbtemperatur der Mikroskop-Beleuchtung, professionelle Digital-Spiegelreflex-Kamera mit 11 bzw. 21 Megapixeln, Aufnahmen im Rohdaten-Format, durchgehendes Farbmanagement, auszumessende Aufnahmen ohne Bildkompression) kolorimetrisch ausgemessen (digitale Bildanalyse) und die Daten statistisch analysiert. Das Verfahren der Fotografie, die Bildanalyse und die detaillierte Darstellung der Daten werden separat publiziert (in Vorbereitung).

Die statistische Auswertung erfolgte nach Formel 1 für die Standardabweichung und Formel 2 für den Mittelwert. Dabei sind x die Hue-Werte 0–255, y die Anzahl der zu x gehörigen Bildpunkte, \bar{x} der Mittelwert und σ die Standardabweichung. Die Bereiche der Farbwerte sind in Tabelle 1 und in Abbildung 2 als $\bar{x} \pm 2\sigma$ eingetragen.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n y_i \cdot (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n y_i}} \quad [1]$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i}{\sum_{i=1}^n y_i} \quad [2]$$

An den Erythrozyten, Kernen, Zytoplasmata und Granula ermittelten wir die in Tabelle 1 dargestellten Farbton-Werte. Die dort als „normal“ bezeichneten Farbtöne von Erythrozyten und Kernen können als Referenzwerte für die Qualitätskontrolle der Färbemethode benutzt werden.

Die orthochromatischen Erythrozyten eignen sich besonders gut für die Qualitätsprüfung der Färbung, da sie (a.) ein ausgesprochen schmales Farbspektrum aufweisen (d.h. homogen sind) und sich (b.) sehr stark bei Färbefehlern verändern; die Farbtöne normal gefärbter

Kerne und andere Zell-Details sind grundsätzlich viel variabler und ändern sich bei Färbefehlern deutlich weniger.

Chemische Grundlagen der Pappenheimfärbung

Die handelsüblichen Fertiglösungen von May-Grünwald („May-Grünwalds Eosin-Methylenblau“) und Giemsa („Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau“) enthalten (a.) die essenziellen Farbstoffe Azur B (blau) und Eosin Y (rot), und daneben (b.) „polychromiertes“ Methylenblau (blau), das durch seine Oxidationsprodukte (Methylen-Violett, Azur A, Azur B, Azur C und Thionin) ebenfalls färberisch wirksam ist (z.B. Basophilie der Zytoplasmata) und zudem stabilisierend auf die Lösungen wirkt.

Die eigene Herstellung von Farblösungen ist aufwändig und erfordert eine Anpassung des Färbeprotokolls nach jedem Ansatz, damit ein stabiles Ergebnis erreicht wird [24]. Die hier verwendeten Fertiglösungen der Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ergeben seit Jahren eine identische Färbung ohne Anpassung des Protokolls.

Die chemischen und physikalischen Grundlagen der „Romanowsky-Giemsa-Färbungen“ sind seit etwa 1990 weitgehend geklärt. Grundlegende Analysen und Beschreibungen findet man v.a. in den Arbeiten von Wittekind (z.B. [15]) und Marshall (z.B. [25]) und ihren Mitarbeitern; zuletzt hat RW Horobin 2011 eine umfassende Beschreibung der komplexen Vorgänge der Färbung und der Einflüsse von Materialdichte, Fixation des Materials etc. veröffentlicht [23].

Die Färbung beruht auf drei grundlegenden Effekten:

- **Säure-Base-Charakter der Farbstoffe und der anzufärbenden Strukturen:** Basische Farbstoffe wie Methylenblau oder Azur B färben saure („basophile“) Strukturen (z.B. DNA des Kerns), saure Farbstoffe wie Eosin Y färben basische („azidophile“ bzw. „eosinophile“) Proteine mit freien Aminogruppen. Dies erklärt auch den Einfluss des pH-Wertes auf die Färbung. Diesen Mechanismus hat zuerst Paul Ehrlich [2] erkannt, später hat Alfred Pischinger [26] die chemischelektrostatische Färbetheorie ausgearbeitet.
- **Metachromatischer Effekt:** Bestimmte Farbstoffe der Thiazinreihe (wie Azur B oder Toluidinblau) bilden bei hohen Konzentrationen Dimere, die Licht anders absorbieren als die Einzelmoleküle und damit eine andere Farbe besitzen. Die sauren

Mucopolysaccharide der Granula der Mastzellen und der basophilen Granulozyten binden den Farbstoff derart dicht, dass der metachromatische Effekt auftritt.

- **Romanowsky-Effekt:** Er verursacht die rötlich-violetten Farbtöne in den Zellkernen und in bestimmten Granula. Dieser Effekt ist eine Kombination der oben genannten Vorgänge. Er wurde um 1980 insbesondere in den Arbeitsgruppen von Wittekind und Marshall aufgeklärt. An bestimmten Molekülstrukturen kommt es zur Anlagerung, dann zur Dimer-Bildung von Azur B und schließlich zur Komplexbildung mit Eosin Y („Charge-transfer-Komplex“), und damit zu einer selektiven Anfärbung. Dabei entsteht eine neue Farbe (Wellenlänge 552 nm), nicht lediglich eine Mischung der Farben von Azur B und Eosin Y. Der Romanowsky-Effekt tritt nur bei ausreichender Konzentration von Azur B auf, nicht mit der reinen „Muttersubstanz“ Methylenblau, nur schwach mit polychromiertem Methylenblau.

Der Farbton und die Intensität der Färbung sind von vielen Variablen abhängig:

- Vorhandensein einer Pufferung der Farblösungen und Höhe ihres pH
- Konzentration der Farblösungen
- Lösungsmittel (Alkohol bzw. Wasser)
- Dauer der Färbung bzw. der Entfärbung
- Temperatur der Lösungen (höhere Temperatur beschleunigt die Färbung und die Entfärbung)
- Zellreichtum bzw. der Schichtdicke der Präparate
- Fixation der Präparate (z.B. vermindert Formalin die Anfärbbarkeit v.a. durch Eosin Y)
- Penetrierbarkeit der Strukturen, Molekülgröße der Farbstoffe (z.B. werden die Nukleolen nicht rötlich gefärbt, weil Eosin Y wegen seiner Größe und wegen der Dichtigkeit des Nukleolus sehr viel später eindringt als Azur B)
- Volumen der Farblösung pro Objektträger
- Überlagerung des Präparats z.B. durch Schleim oder Fett
- Alterung der Gebrauchslösungen (die Farbstoffe werden durch die Verdünnung instabil)

Steigende Konzentration der Farbstoffe und zunehmende Färbedauer steigern die Intensität der *progressiven* Färbung. Wegen der geringeren Molekülgröße färbt zuerst Azur B, dann Eosin Y, anschließend tritt der Romanowsky-Effekt ein. Alkohole durchdringen Gewebe schneller als Wasser und beschleunigen dadurch die Färbung. Die Präparate werden zunächst überfärbt (in

unserem Standard-Protokoll stärker als bei *Pappenheims* Originalfärbung), wodurch auch dichte Anteile des Präparats ausreichend angefärbt werden (z.B. Zellen in Knochenmark-Bröckeln). Die überfärbten Anteile werden in der Pufferlösung wieder langsam entfärbt (*regressive* Färbung, *Differenzierung*), daraus resultiert eine in dünnen und dichten Anteilen ähnlich intensive Anfärbung.

Die alkoholische *May-Grünwald*-Lösung färbt besonders die Zytoplasmata und die metachromatischen Granula an, die Kernstruktur wird scharf abgebildet. Der *Romanowsky*-Effekt tritt anschließend in der wässrigen *Giemsa*-Färbung durch Azur B und Eosin Y auf, die Kerne erhalten eine vom Zytoplasma deutlich unterscheidbare rötlich-violette Farbe.

Das Ergebnis der *Pappenheim*-Färbung ist ähnlich wie das der von Hämatopathologen verwandten *Giemsa*-Färbung. In der *Giemsa*-Histologie sind aber die Chromatinstrukturen gröber und kontrastreicher, die Zytoplasmata und die Granula sind weniger deutlich abgebildet (v.a. wegen der Formalin-Fixation). In der HE-Histologie sind die Nukleolen prominenter dargestellt, die Zytoplasmata wenig differenziert abgebildet.

Für eine zuverlässige *Pappenheim*-Färbung ist die Verwendung von *gepuffertem* Wasser von entscheidender Bedeutung, insbesondere dann, wenn aus Kostengründen *aqua demineralisata* anstelle von *aqua destillata* verwendet wird. Eigene kolorimetrische Ergebnisse zeigen, dass bei Verwendung von *ungepuffertem* Wasser nicht nur (a.) eine Farbverschiebung in den bläulichen Bereich stattfindet, sondern dass zudem (b.) sowohl rote als auch blaue Farbtöne stark vermindert gesättigt dargestellt werden, was ein *graues* Aussehen bewirkt, und dass (c.) die Anfärbung weniger *spezifisch* wird; so wird z.B. das Farbton-Spektrum von Erythrozyten breiter, ohne die typische Form der Verteilung mit einer sehr hohen Spitze am Mittelwert. Die Wasser-Pufferung ist sowohl für die *progressive* Anfärbung als auch für die *regressive* Entfärbung bedeutsam (vorläufige eigene Daten).

Mit steigendem pH nehmen die Blau-Töne zu, mit fallendem pH nehmen die Rot-Töne zu; unsere Vorschrift mit dem pH von 6,8 verursacht einen rein-roten bis rot-gelben Farbton der Erythrozyten. Die Auswahl eines bestimmten pH in der Nähe des Neutralpunktes ist wahrscheinlich weniger bedeutsam für die Qualität der Färbung als die Tatsache der Pufferung selbst. Es ist aber wahrscheinlich, dass bestimmte Strukturen bei starker Abweichung vom neutralen pH nicht nur in geändertem Farbton dargestellt werden, sondern sich bei ungünstigem pH auch weniger intensiv anfärben (z.B. basophile Granula der Granulozyten).

Probenvorbereitung

Die hier beschriebene *Pappenheim*-Färbung ist für Ausstriche beliebiger Flüssigkeiten und Gewebe geeignet, für dünne Präparate (wie Blutausstriche oder Zytozentrifugenpräparate), für dünne Präparate mit Anteilen von Gewebe (z.B. Knochenmarkausstriche) und für dichte Gewebe-Präparate (z.B. Organzytologie, Lymphknotenzytologie).

Blut, Knochenmarkaspirat, etc. sollen bei Raumtemperatur transportiert und umgehend aufgearbeitet werden. Die Präparate können nach intensiver Trocknung bei Raumtemperatur sofort gefärbt werden (dies dauert bei Knochenmark-Präparaten etwa 30 Minuten, wenn man ohne Ventilator trocknet).

Bereits nach wenigen Stunden zwischen Materialentnahme und Aufarbeitung sind leichte Veränderungen an feinen Struktur-Details sichtbar, nach 48 Stunden stark störende Artefakte v.a. in den Kernen. Liquor cerebrospinalis muss umgehend körperwarm durch Boten überbracht und aufgearbeitet werden. Einige Zelltypen sind extrem empfindlich, so dass bereits nach wenigen Stunden nahezu alle Zellen untergegangen sind (z.B. Burkitt-Lymphom im Blut oder in einem Pleuraerguss; eigene Beobachtungen). Der Farbton ändert sich aber kaum, z.B. zeigt vor dem Anfertigen der Ausstriche eine Woche lang bei Zimmertemperatur gelagertes peripheres Blut keine kolorimetrisch erfassbaren Veränderungen des Farbtons von Erythrozyten oder Kernen, obwohl die zellulären Strukturen hochgradig verändert sind (eigene Daten).

Fertige Ausstriche verändern ihr Färbeverhalten bis etwa 48 Stunden zwischen Ausstrich und Fixation bzw. Färbung nicht wesentlich, nach 2 Wochen werden unfixierte Präparate blaugrau-stichig, verlieren Rot-Töne und verlieren erheblich an Farbsättigung. Die Farbmesung zeigt dann eine starke Verschiebung weg von den Rot-Tönen zum Blauen hin, die Verteilung der Erythrozyten-Farbtöne wird deutlich verbreitert. Wenn erst später gefärbt werden kann (z.B. bei der Anfertigung von sehr vielen Objektträgern für Ringversuche), sollen die Präparate direkt nach der Trocknung mit Methanol fixiert werden; die anschließende Färbung soll aber nicht länger als zwei Wochen aufgeschoben werden.

Länger als 2 Wochen unfixiert gelagerte oder über längere Zeiträume gelagerte fixierte Präparate können vor der Färbung durch Inkubation in Puffer (über 30 Minuten bei 37°C, dann erneute Trocknung; vereinzelt Angaben in alter Literatur) oder durch saure Fixation verbessert werden (Methanol mit 1–2% Essigsäure, anschließend Essigsäure durch Inkubation in Puffer (30 min)

auswaschen, Präparat trocknen, neu fixieren; eigene Beobachtung). Systematische Untersuchungen dieser Verfahren sind noch im Gang.

Die Objektträger sollen nicht nur mit Bleistift auf dem Glas-Mattrand beschriftet werden, da die Beschriftung mit öligen Fingern leicht abgewischt werden kann. Sie können mit Bleistift auf einem Farbfeld oder mit einem Tusche-Filzschreiber auf Glas oder Farbfeld beschriftet werden, der selbst die Färbung und das Eindecken der Präparate übersteht (z.B. *Edding 8404 „aerospace marker“*).

Die Objektträger müssen staubfrei, trocken und ohne Kontakt zu Chemikalien aufbewahrt werden (z.B. nicht in der Nähe von Formalin oder Säuredämpfen) und sollen erst direkt vor Verwendung aus der Packung entnommen werden.

Der Farbstandard wird erreicht, wenn entweder keine Antikoagulation des Ausgangsmaterials stattfindet (z.B. Feinnadel-Aspirat, Fingerbeeren-Blutausstrich) oder bei Antikoagulation durch isotones Natrium-EDTA 1,107%. Das saure Mucopolysaccharid Heparin verfälscht die Färbung schon bei geringer Konzentration schwerwiegend, Natrium-Zitrat erst bei höherer Konzentration (über 30% des Probenvolumens).

Färbelösungen

Hier sind nur die Produkte von *Merck* angegeben, das Protokoll ist nur damit ausgiebig überprüft worden. Wenn Produkte anderer Hersteller verwendet werden sollen, ist eine Überprüfung der Färbung erforderlich, wie in Abschnitt Qualitätskontrolle der Färbung beschrieben.

1. **May-Grünwald** (*Merck N^o101424*). Bei geringem Verbrauch Originalflasche in kleine Flaschen portionieren
→ Gebrauchslösung: **1 Teil May-Grünwald + 1 Teil Puffer**; Filtration nicht erforderlich
2. **Giemsa** (*Merck N^o109204*). Bei geringem Verbrauch Originalflasche in kleine Flaschen portionieren
→ Gebrauchslösung: **1 Teil Giemsa + 6 Teile Puffer**; nach der Verdünnung filtrieren (Faltenfilter mit einer Porengröße von 4–7 µm, z.B. *Whatman grade 597½*). Filter zuerst mit Puffer anfeuchten. Die Filtration ändert die Färbintensität nicht (eigene Daten), verhindert aber Farbniederschläge.
3. **Methanol** (*Merck N^o106009*), p.a. Methanol ist hygroskopisch: Vorratsflasche und Küvette sofort wieder

verschließen; Bei geringem Verbrauch Originalflasche in kleine Flaschen portionieren

4. **Puffer** Der pH des Puffers soll im Bereich von 6,75–6,85 liegen. Dies kann mit verschiedenen Vorschriften erreicht werden:
 1. Verwendung von „Puffertabletten“
 - i. *aqua destillata* und Puffertabletten:
 - A. 10 Puffertabletten (*Merck N^o111374*, pH 6,8) in 10 L *aqua destillata* auflösen, gründlich mischen; nach ca. 1 Stunde hat sich ein stabiler pH eingestellt
 - B. pH messen, er muss wahrscheinlich nicht korrigiert werden
 - ii. *aqua demineralisata* und Puffertabletten:
 Bei Verwendung von *aqua demin.* aus einer Entsalzungsanlage muss der Puffer in vielen Laboratorien (je nach Qualität des entsalzten Wassers) stärker und unterschiedlich korrigiert werden
 - A. Bei stabiler *aqua demin.*-Qualität kann, falls erforderlich, eine feste Korrektur des Puffers vorgenommen werden (Korrekturmaßnahmen siehe unten); die Pufferqualität soll in regelmäßigen Intervallen kontrolliert werden
 - B. Bei instabiler *aqua demin.*-Qualität empfiehlt sich die Verwendung von *aqua dest.* oder die Anfertigung des Puffers nach der unten aufgeführten Vorschrift
 - iii. Die Pufferlösung ist ca. 4 Wochen haltbar
 2. Puffer selbst ansetzen
 - i. *aqua destillata* (*aqua demineralisata*): **10 L**
 - ii. NaOH (*Merck N^o109140*, pH 13) 0,2 mol: **125 mL**
 - iii. KH₂PO₄-Stammlösung 0,2 mol herstellen:
 - A. 27,22 g KH₂PO₄ (*Merck N^o104873*, pH 4,4)
 - B. In 1.000 mL *aqua destillata* auflösen
 - C. In brauner Flasche gekühlt 1 Monat haltbar
 - iv. KH₂PO₄ 0,2 mol: **290 mL**
 - v. *aqua dest.*, NaOH und KH₂PO₄ in 10 L-Flasche gründlich mischen; nach ca. 1 Stunde hat sich ein stabiler pH eingestellt
 - vi. pH messen und ggf. auf 6,75–6,85 korrigieren: pH anheben mit NaOH oder absenken mit KH₂PO₄; dabei jeweils gründlich in der Flasche mischen und nach jeder Zugabe wieder mehrere Minuten warten vor erneuter pH-Kontrolle
 - vii. Endkontrolle des Puffers nach 1 Stunde
 - viii. Die Pufferlösung ist ca. 4 Wochen haltbar

Färbeprotokoll

Das Protokoll der *Pappenheim*-Färbung ist in Tabelle 2 abgebildet. Die dort angegebenen Vorschriften müssen exakt eingehalten werden. Anpassungen an lokale Faktoren sind nahezu niemals erforderlich, entsprechende Empfehlungen sind aber in Abschnitt Modifikation der Färbung angegeben.

Ablauf der Färbung

Eigene Experimente (in den hämatologischen Laboratorien der Universität Ulm und des Helios Klinikum Wuppertal, bestätigt u.a. in den Laboratorien von *H. Diem* und *T. Nebe*) haben ergeben, dass eine optimal kräftige Anfärbung und gleichzeitige optimale Chromatindarstellung erreicht werden, wenn die Präparate zuerst in Methanol fixiert werden, dann in verdünnter *May-Grünwald*-Lösung, anschließend in verdünnter *Giemsa*-Lösung gefärbt werden und dann in mehreren Schritten in Pufferlösung entfärbt werden. Die vielfach empfohlene Kombination von Fixation und *May-Grünwald*-Färbung durch konzentrierte *May-Grünwald*-Lösung, mit nachfolgender *Giemsa*-Färbung und Entfärbung führt zu

Dauer	Medium	Verd.	Kommentar
	Luft		rasch intensiv trocknen
10 Min	Methanol		<i>Fixierung, Permeabilisierung</i>
7 Min	<i>May-Grünwald</i>	1+1	<i>alkoholische Färbung</i>
10 Sek			abtropfen lassen, nicht spülen
20 Min	<i>Giemsa</i>	1+6	<i>wässrige Färbung</i>
10 Sek	Puffer		<i>Differenzierung</i>
4 Min	Puffer		<i>Differenzierung</i>
4 Min	Puffer		<i>Differenzierung</i>
	Luft		trocknen ggf. eindecken

Tabelle 2 Protokoll der *Pappenheim*-Färbung (MAE).

Die Ausstriche müssen sofort intensiv, am besten mit Ventilator getrocknet werden und sollen gleich nach Trocknung, spätestens innerhalb von 3 Tagen gefärbt werden; für eine spätere Färbung sollen sie gleich nach Anfertigung und Trocknung fixiert werden. Die Küvetten müssen immer abgedeckt sein. Methanol und die Farblösungen müssen täglich frisch angesetzt werden, auch wenn sie kaum oder nicht benutzt wurden. Sowohl für die Färbung als auch für die Entfärbung muss gepuffertes Wasser verwendet werden. MAE, polychromes Methylenblau, Azur B und Eosin Y; Min, Minuten; Sek, Sekunden; Puffer: pH 6,8; *May-Grünwald* bzw. *Giemsa*: frisch angesetzte verdünnte Arbeitslösungen [Stammlösung+Puffer].

einer vermindert detaillierten Chromatin-Darstellung, die Präparate sind bei dieser Kombination eher zu stark angefärbt. Es ist offenkundig, dass der von *Pappenheim* angegebene Schritt einer Färbung mit verdünnter *May-Grünwald*-Lösung nicht ausgelassen werden darf. Die von *Pappenheim* vorgeschriebene Fixation durch konzentrierte *May-Grünwald*-Lösung kann aber durch die Methanol-Fixation ohne Verlust ersetzt werden.

In einigen Färbvorschriften wird zwar die *progressive* Färbung mit gepuffertem Wasser ausgeführt, die *regressive* Färbung bzw. *Differenzierung* aber mit ungepuffertem Wasser. Diese aus färbechemischer Sicht unverständliche Empfehlung führt zu einer schwerwiegenden Veränderung der Färbung (eigene Daten) und muss vermieden werden.

Die intensive Lufttrocknung und intensive Fixation mit Methanol sind insbesondere für die Darstellung des Chromatins und für die Beurteilung der Gewebestrukturen von entscheidender Bedeutung, wahrscheinlich bedeutsamer als geringe Variationen der restlichen Färbeprozedur [1]. Dies ist vor allem bei der Bearbeitung von auswärts angefertigten Ausstrichen zu beachten (Einsender entsprechend informieren!).

Unsere Färbvorschrift (vgl. Protokoll in Tabelle 2) gilt für die Färbung in 600 mL-Küvetten mit 40 Objektträgern, mit oder ohne Bewegung der Objektträger. Für Geräte mit automatischer Objektträger-Bewegung und die Färbung einzelner Objektträger auf der Färbepbank muss die Vorschrift evtl. geändert werden. Das Volumen der Küvetten im Verhältnis zur Objektträger-Zahl soll nicht kleiner sein.

Die Färbvorschrift gilt für normale Raumtemperatur, bei höherer Temperatur laufen die Färbung und die Entfärbung erheblich schneller ab. Nach bisher vorliegenden eigenen kolorimetrischen Daten beeinflusst selbst eine Temperatur zwischen 37°C und 42°C weder die Farbtöne noch die weiteren Charakteristika der Färbung. Dies ergab die Analyse einer größeren Serie von Präparaten, die von verschiedenen Laboratorien mit Automaten hergestellt wurden, die Blutausstriche herstellen und mit einem erheblich verkürzten Färbeprotokoll färben, unter Verwendung der hier genannten Färbelösungen und eines Phosphatpuffers mit pH 6,8.

Nach dem Ausstreichen des Materials und nach der Färbung ist jeweils eine *Schock-Trocknung* mit Ventilator empfehlenswert, v.a. bei dickeren Präparaten wie Knochenmark-Ausstrichen und bei großen Ausstrichserien. Die Trocknung ohne Ventilator ist v.a. bei höherer Luftfeuchtigkeit nicht zuverlässig. Unzureichende Trocknung vor der Färbung verursacht schwerwiegende Artefakte, vgl. Abschnitt Färbeartefakte. Nicht mit Hitze trocknen, sonst entstehen schwere Artefakte.

Die Farblösungen, die Pufferlösungen und das Methanol müssen täglich erneuert werden; sie sind für maximal 5 Durchgänge mit Blutaussstrichen oder für maximal 3 Durchgänge mit dichtem Gewebe verwendbar (entspricht 200 bzw. 120 Objektträgern bei 600 mL-Küvetten). Verbrauchte Färbelösungen bzw. Pufferlösungen führen zu verminderter Farbtintensität und zu einer Verminderung der Rot-Töne. Zu dieser veränderten Anfärbung führt wahrscheinlich eine Kombination aus (a.) Verlust der Farbstoffe durch Ausfällung in der verdünnten Farblösung, (b.) Verminderung der Konzentration des Methanols, (c.) Verbrauch der Farbstoffe und (d.) Verbrauch der Pufferkapazität.

Es ist jedoch empfehlenswert, den ersten Puffer der *Differenzierung* nach 3 von 5 Durchgängen zu entfernen, den zweiten und dritten Puffer um eine Position nach vorne zu schieben und einen neuen Puffer am Ende der Färbung einzusetzen.

Bei einem hohen Anteil von Präparaten, die Fett oder Schleim enthalten, wie z.B. Knochenmarkaspirat oder Bronchialzytologie, muss das Methanol nach 3 Durchgängen erneuert werden.

Auch unbenutzte oder wenig verwandte Farblösungen müssen spätestens am Ende eines Arbeitstages ausgewechselt werden, da die Farbstoffe in den *verdünnten* Farblösungen instabil werden und sich damit ihre Zusammensetzung verändert; insbesondere verschiebt sich das Verhältnis zwischen AzurB und EosinY zu Ungunsten von Eosin Y.

Die Küvetten müssen stets abgedeckt werden, da (a.) Methanol stark hygroskopisch ist und verwässertes Methanol zu schlechter Chromatindarstellung und zu vermindertem Eindringen der Farbstoffe in die Zellen und damit zu verminderter Anfärbung führt und da (b.) sich auf der *Giemsa*-Lösung durch Reaktion mit der Luft ein zunehmend dichter Farbfilm bilden kann, der zu Farbschlieren auf den Objektträgern führt.

Modifikation der Färbung

Die Färbungscharakteristika dieses Protokolls sind für alle Routinefälle der hämatologischen Zytologie und der Organzytologie optimal geeignet, sie werden konstant erreicht und brauchen normalerweise nicht verändert zu werden. Sollte eine Anpassung erforderlich sein, kann wie folgt vorgegangen werden:

Farbton

Durch Festlegung des pH des Puffers auf 6,8 werden die Farbtöne erreicht, die *Pappenheim* in seiner Vorschrift

beschrieben hat („Die Erythrozyten rein rosarot“, vgl. Abbildung 1) und die seither in den Bild-atlantent vorherrschen. Die kolorimetrisch ermittelten Werte der Farbtöne liegen entsprechend (vgl. Tabelle 1 und Abbildung 2). Der pH soll nicht geändert werden. Durch Verschiebung des pH zum Alkalischen hin werden z.B. die Erythrozyten blauer, durch Verschiebung zum Säuren hin werden sie rot-gelb-grünlich.

Farbsättigung und Helligkeit

Beide werden hauptsächlich durch die Intensität der Färbung und der Entfärbung beeinflusst. Das Protokoll führt unter den angegebenen Bedingungen (Konzentrationen, Zeiten, Verhältnis zwischen Volumen der Küvetten und Zahl der Präparate) zu einer maximal kräftigen Färbung mit hoher Buntheit („Chromacity“), bei der die feinsten Strukturen beispielsweise in Blastenkernen oder Kernen von Monozyten dennoch nicht überdeckt werden, Details aber „ins Auge springen“.

Sollte eine Veränderung von Farbsättigung oder Helligkeit erforderlich sein, soll als erster Schritt nur die *regressive* Färbung (geringfügig!) durch Verlängerung oder Verkürzung der *Differenzierung* in der zweiten und dritten Entfärbungs-Küvette variiert werden, nicht die Farbstoffkonzentrationen oder die Zeiten der *progressiven* Färbung. Eine geringe Intensivierung der Farbsättigung kann in einem zweiten Schritt durch Steigern der Konzentration von *May-Grünwald* auf z.B. 2:1 erreicht werden. Die Veränderung des *Giemsa*-Teils der Färbung ist nicht erfolversprechend, auf jeden Fall soll dieser Teil nicht abgeschwächt werden.

Durch zunehmende Entfärbung nehmen die neutrophile Grundfärbung der Granulozyten-Zytoplasmata, die Färbung der neutrophilen, oxyphilen und basophilen Granula und die Basophilie der Zytoplasmata stark ab; die eosinophilen Granula bleiben fast identisch kräftig angefärbt; die Erythrozyten werden blasser, die Kerne werden blasser und transparenter; die Buntheit nimmt ab, der Farbton aller Details ändert sich aber nicht signifikant. Diese Veränderungen werden bereits bei einer Verlängerung der optimalen Entfärbezeit um 10% sichtbar, bei 30% Verlängerung wird die Abblässung störend stark (eigene kolorimetrische Daten). Die Färbung soll auf maximal tolerable Färbintensität eingestellt werden.

Struktur-Details

Die kontrastreiche Darstellung feinsten Strukturen und die Durchfärbung auch dichter Areale werden wesentlich

durch die intensive Trocknung und Methanolfixation erreicht, diese sollen auch bei dünnen Präparaten nicht verkürzt werden, können aber ohne negative Auswirkungen intensiviert werden. Eine unzureichende Strukturzeichnung ist nahezu immer Folge einer fehlerhaften Trocknung bzw. Fixation der Präparate.

Nachbehandlung der Objektträger

- Unterseite der noch feuchten Objektträger abwischen (kann ausgelassen werden, wenn die Unterseite sauber ist)
- An der Luft bei Raumtemperatur trocknen, am besten mit Ventilator
- Bei Farbschlieren auf dem Präparat (im Lauf einiger Stunden entsteht auf der *Giemsa*-Küvette ein Farbfilm, der die Qualität der Färbung aber nicht beeinflusst): Nach etwa 1 Tag ist ein kurzes Abwischen des ganzen Präparats auch auf der Objektseite mit Methanol möglich
- Präparate eindecken, wenn mit Objektiven 20* oder 40* ohne Ölimmersion gearbeitet werden soll, oder wenn die Präparate für Kurse oder die Mikrofotografie benötigt werden. Bei Verwendung von *Entellan neu* (Merck Nr. 107961) unter Verwendung von Xylol als Lösungsmittel bleibt die Färbung unverändert, andere Eindeckmittel verschieben den Farbton evtl. schwerwiegend (eigene kolorimetrische Daten)
- Gefärbte Präparate halten mit oder ohne Deckglas mehr als 30 Jahre ohne Veränderung der Farben, wenn sie lichtgeschützt aufbewahrt werden. Sie werden aber teilweise im Lauf der Jahre etwas blasser, wenn sie eingedeckt worden waren
- Bereits eingedeckte Präparate können durch langes „Einweichen“ in Xylol ausgedeckt und neu eingedeckt oder nachgefärbt werden
- Fehlerhaft nach *Pappenheim* gefärbte Präparate können neu gefärbt werden: Zuerst in Methanol/Puffer-Gemisch [1+1] (bei alten Präparaten mit 1–2% Essigsäure) so lange entfärben, bis keine Farbe mehr sichtbar ist; das kann bei Bröckelhaltigen Präparaten Stunden bis Tage dauern. Anschließend ggf. Essigsäure durch Inkubation in Puffer (30 min) auswaschen, Präparat trocknen, neu fixieren und färben. Die neue Färbung entspricht bei älteren Präparaten nicht einer guten originalen Färbung

Reinigung des Färbegeschirrs

Küvetten, Trichter, Messzylinder und Objektträger-Halter sollen nur mit dem Methanol-Abfall und Leitungswasser gereinigt werden, nicht mit Spülmitteln oder mit Chemikalien (z.B. Salzsäure). Reste dieser Substanzen können schwere Artefakte verursachen. Eine nach Reinigung verbliebene leichte Blaufärbung des Färbegeschirrs wirkt sich auf die Färbung nicht aus.

Färbeartefakte

Abweichungen vom korrekten Ergebnis sind häufig Folge einer (a.) falschen Vorbereitung der Probe oder einer (b.) fehlerhaften Färbeprozedur, selten Folge von (c.) Ereignissen nach Abschluss der Färbung. Die nachfolgende Auflistung beschreibt einige häufigere Artefakte und weist auf zugrunde liegende Fehler hin (☞). Dies gilt nur bei Verwendung der Lösungen der Firma *Merck*, Farblösungen anderer Hersteller ergeben teilweise erheblich unterschiedliche Färbungen.

- Grau bis grau-blau und wenig „bunt“ wirkende Färbung ☞ (a.) Verbrauch der Farbstoffe durch zu hohe Zahl gefärbter Objektträger, oder (b.) alte Farblösung (≥ 12 Stunden), oder (c.) Präparat später als 2 Wochen nach Anfertigung gefärbt (vgl. Abbildung 10), oder (d.) ungepuffertes Wasser
- Schwach angefärbte neutrophile Zytoplasmata und neutrophile Granula, fehlende Granula der Thrombozyten, kaum sichtbare Thrombozyten-Zytoplasmata, blasse basophile Zytoplasmata ☞ alte Färbelösungen oder falsche Färbezeiten oder Farbstoff-Konzentrationen (vgl. Abschnitt Modifikation der Färbung)
- Rot-violetter Hintergrund und rote Bröckel, Kerne blau anstatt blaurot ☞ Präparat mit Heparin antikoaguliert (auch bei geringer Heparin-Konzentration!), vgl. Abbildung 9
- Erythrozyten grau-blau, Kerne graublau, Rot-Töne fehlen, Zytoplasmata kaum angefärbt ☞ Präparat mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd vorfixiert, beispielsweise durch undichte Behälter einer gleichzeitig eingesandten Stanzbiopsie, vgl. Abbildung 8
- Dichte Areale (Bröckel) unterfärbt, aber gut gefärbte Blutausrüche bzw. dünne Areale ☞ Fixation ungenügend (zu kurz, Methanol verwässert, Methanol mit viel Fett vorbelastet) oder zu wenig intensive Färbung (Dauer, Konzentration)
- Bläuliche Erythrozyten, auffälliger bläulicher Hintergrund, Rot-Töne insgesamt vermindert,

- polychromatische Erythrozyten nicht abgrenzbar ➔ fehlende Pufferung des Wassers oder stark verspätete Färbung der unfixierten Ausstriche oder pH des Puffers zu hoch; die Erythrozyten reagieren viel stärker auf diese Störeinflüsse als Kerne, Granula oder basophile Zytoplasmata; (blauer Hintergrund auch bei Paraproteinämie trotz korrekter Färbung der Zellen!)
- Leuchtend rot-orange Erythrozyten, fehlende Basophilie der Zytoplasmata ➔ pH des Puffers zu niedrig
 - „Kristalle“ in den Erythrozyten, Stechapfelformen ➔ verwässerte Fixation, unzureichend getrocknete Objektträger; unvollständige oder zu langsame Trocknung verursacht nicht nur sehr störende Artefakte an den Erythrozyten, sondern auch degeneriertes Chromatin und verminderte bis fehlende Granulation der Zytoplasmata. Die Präparate dürfen erst nach guter Trocknung in Versandbehälter verpackt werden (vgl. Abbildung 7)
 - Kerne ohne Rot-Töne ➔ falsche Pufferlösung, verbrauchte oder alte Farblösungen, zu kurze Färbezeit (die Rot-Färbung der Kerne kommt später zustande als die Blaufärbung)
 - Chromatin aufgequollen und teils verklumpt, Erythrozyten bizarr verformt, Pelger-artige Kerne der Granulozyten, evtl. Thrombozyten aggregiert ➔ nicht aufgearbeitetes Material (z.B. Blutröhrchen) wurde vor dem Ausstreichen zu lange gelagert (bei Zimmertemperatur sind Alterungsartefakte schon nach wenigen Stunden bemerkbar; Lagerung im Kühlschrank verursacht noch stärkere Artefakte!)
 - Blaue prominente Nukleolen ➔ voranschreitende Zellauflösung schon vor Anfertigung der Präparate oder unzureichende Fixierung führen zu einem Aufbrechen der Kernstruktur und zu einer erhöhten Permeabilität und dadurch zu einer „Demaskierung“ des Nukleolus und einer intensiveren Anfärbung der RNA im Nukleolus (vgl. Abbildung 5: wenig prominente aber abgrenzbare Nukleolen).
 - Kerne aufgeplatzt, Chromatin zerfließt, Erythrozyten unversehrt, Farben korrekt ➔ Detergenzien auf den Objektträgern oder auf dem Färbegeschirr
 - Vakuolen in den Kernen und im Zytoplasma ➔ Methanol wegen zuvor gefärbter fettreicher Präparate (Knochenmark!) verbraucht, die Überlagerung mit Fett-Tropfen behindert die Anfärbung
 - Diffuse bläuliche Farbniederschläge ➔ *Giemsa*-Lösung nicht abgedeckt, Objektträger nicht tief genug in Entfärbung eingetaucht
 - Bläuliche Granula (<1 µm) im Hintergrund und über den Zellen ➔ *Giemsa*-Lösung nicht filtriert oder Färbegeschirr unzureichend gereinigt

- Präparat kann bei hoher Vergrößerung (Objektiv 40*, 100*) nicht scharf gestellt werden ➔ zu viel Einschlussmittel unter dem Deckglas, doppeltes Deckglas
- Nicht eingedecktes Präparat stellenweise entfärbt nach Anwendung von Immersionsöl ➔ Alkoholhaltiges Immersionsöl
- Farbverschiebung trotz vollständig eingehaltenem Protokoll ➔ ungeeignetes Eindeckmittel?

Qualitätskontrolle der Färbung

Die Färbung muss bei Neueinführung des Protokolls und danach regelmäßig z.B. halbjährlich überprüft werden. Dabei sollten zumindest ein Blutausstrich, besser noch ein Blutausstrich und ein Bröckelhaltiges Präparat und ein für das jeweilige Labor typisches oder kritisches Präparat analysiert werden. Als Grundlage für den visuellen Vergleich mit dem Farbe-„Standard“ sind in den Abbildungen 3 bis 10 einige Beispiele korrekter und falscher Färbergebnisse abgebildet; die Checkliste in Tabelle 3 hilft bei der Abarbeitung der visuellen Phänomene; objektive kolorimetrisch ermittelte Farbwerte können der Tabelle 1 entnommen werden.

Routine-Laboratorien sollten zumindest eine visuelle Überprüfung der Färbung vornehmen. Zusätzlich ist bei Neueinführung des Protokolls eine objektive Qualitätskontrolle durch Kolorimetrie empfehlenswert (vgl. Abschnitt Objektive Überprüfung durch Farbmessung). Laboratorien, die Ausstriche für die Qualitätskontrolle (z.B. Ringversuche) anfertigen, sollten jeden Fall vor der Versendung visuell und kolorimetrisch überprüfen.

Abweichungen vom Standard-Farbtönen werden sowohl bei einer visuellen als auch bei einer kolorimetrischen Überprüfung leicht an den orthochromatischen Erythrozyten erkannt; ihre Farbtöne sind sehr homogen (schmales Farbspektrum), in unterschiedlichen Laboratorien bei gleichem Farbe-Protokoll immer gleich und verändern sich durch Färbefehler sehr stark, sehr viel stärker als z.B. die Kerne (eigene Daten).

Subjektive visuelle Überprüfung

Die Präparate sollen so kräftig gefärbt sein, dass die Granula der Granulozyten schon bei geringer Vergrößerung „ins Auge springen“ und nicht erst bei höherer Vergrößerung (Objektiv 40*) gut abgrenzbar sind. Eine zu wenig intensive Färbung zeigt die Struktur-Details nicht ausreichend kontrastreich an, was z.B. die Unterscheidung von unreifen und reifen Zellen erschwert und zeigt nicht

-
- Makroskopisch kräftig rötlich gefärbter Blutausstrich ohne Blaustich
 - Hintergrund zwischen den Zellen nur gering angefärbt ohne Farbniederschläge oder Farbgranula
 - Erythrozyten kräftig angefärbt rein-rot bis rot-gelb ohne Blaustich
 - Erythrozyten scharf begrenzt mit deutlicher zentraler Aufhellung (im Bereich des Präparats, in dem die Zellen dichter, weniger ausgebreitet liegen)
 - Polychromatische Erythrozyten gut abgrenzbar (in der Fahne des Ausstrichs suchen)
 - Kernhaltige Zellen kräftig gefärbt, die Granula „springen ins Auge“
 - Kerne intensiv blau-rot gefärbt, nicht nur blau; Nukleolen (wenn sichtbar) blau ohne Rotstich
 - Chromatin teils undurchsichtig dunkel (z.B. Chromatinschollen von Granulozytenkernen), bei Blasten und Monozyten durchsichtig netzartig mit Darstellung feiner Fädchen oder Körnchen (bei nicht-hämatopoetischen Zellen)
 - Zytoplasma neutrophiler Granulozyten deutlich angefärbt, nicht „leer“, neutrophile Granula auf diesem Hintergrund deutlich dunkler als das Zytoplasma und gut abgrenzbar; neutrophile Granula „unreifer“ Granulozyten rötlicher angefärbt; Primärgranula bei toxischer Granulation größer und blau-rot
 - Basophiles Zytoplasma zwischen hellblau und dunkelblau angefärbt ohne Rotstich, nicht nur grau; rötliche Granula bei Monozyten, bei granulierten Lymphozyten und bei myeloischen Blasten kräftig angefärbt und gut abgegrenzt
 - Zytoplasma der Thrombozyten hellblau gefärbt, mit deutlich abgegrenzten rötlichen Granula
-

Tabelle 3 Checkliste für die visuelle Überprüfung der Färbung.

alle Granula deutlich, wodurch z.B. die Unterscheidung einer schwachen Granulation der Granulozyten von einer fehlenden Granulation unmöglich wird. Eine zu intensive Färbung führt zu *undurchsichtigen* Kernen und zu tiefblauen Zytoplasmata, die die Granula fast überdecken und bewirkt bläuliche Erythrozyten, die von polychromatischen Erythrozyten nur schwer zu unterscheiden sind.

Der Hintergrund (Plasma-Eiweiß) zwischen den Zellen darf allenfalls leicht gelb-rosa gefärbt sein. Die Erythrozyten sollen mäßig intensiv rein-rot bis rot-gelblich angefärbt sein ohne Blaustich oder Orange-Grün-Stich. Die Zytoplasmata der neutrophilen Granulozyten sollen hell gelblich-rötlich angefärbt sein, die Zytoplasmata der Monozyten leicht bläulich, die der Lymphozyten unterschiedlich dunkel basophil ohne Rotstich.

Die rötlichen Granula der Thrombozyten sollen in einem gering bis mittelgradig stark blau gefärbten Zytoplasma gut abgrenzbar sein. Die Granula der Granulozyten sollen gut abgrenzbar angefärbt sein, neutrophil (d.h. rot-braun) oder basophil (d.h. stark angefärbt rot-blau-braun) oder eosinophil (d.h. leuchtend und kräftig rot-orange), Granula lymphatischer Zellen oxyphil (d.h. rötlich-violett); vgl. Abbildungen 3 bis 4.

Das Chromatin ist in einigen Zellen stellenweise flächhaft oder schollig angeordnet (z.B. Lymphozyten oder Granulozyten). Die optimale Chromatindarstellung kann z.B. an Monozyten abgelesen werden, dort soll es ohne Verklumpung fein aufgelöst abgebildet sein, wechselnd sehr dicht bis fein netzartig. Das Chromatin soll rötlich-blau angefärbt sein, nicht nur blau (aber: reife rote Vorstufen haben rein blaue Kerne). Die Nukleolen normaler Blutzellen sind nicht prominent, sie sind anders als der Kern rein blau gefärbt.

Die Zellen in den Bröckeln sollen ebenso kräftig angefärbt sein wie im freien dünneren Ausstrich-Anteil (vgl. Abbildung 6). Ansonsten ist entweder die Trocknung vor der Färbung unzureichend, oder die Fixierung ist unzureichend (zu kurz oder das Methanol verwässert oder mit Fett übersättigt), oder die Färbezeit ist zu kurz.

Die in Abschnitt Färbeartefakte beschriebenen Artefakte dürfen nicht vorhanden sein. Die Prüfkriterien in Tabelle 3 sollen bei der visuellen Qualitätskontrolle der Färbung am besten an einem Blutausstrich komplett abgearbeitet werden. Sind alle Kriterien erfüllt, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein korrekter Ablauf der Färbung im engeren Sinne vor (zusätzlich können aber Artefakte vorliegen, wie z.B. „Löcher“ in Erythrozyten bei falscher Fixation).

Wenn die Farbtöne nicht dem Standard entsprechen, muss die gesamte Prozedur überprüft werden. Bei Auswertung zahlreicher Fälle aus verschiedenen Laboratorien waren fehlerhafte Färbungen zumeist durch die Verwendung von ungepuffertem Wasser oder einen falschen pH der Pufferlösung verursacht. Nach Ausschluss einer fehlenden oder falschen Pufferlösung müssen alle folgenden Details untersucht werden:

- Arbeitsplatz ◀ z.B. chemische Einflüsse durch Formaldehyd oder Säuredämpfe oder Azeton
- Objektträger ◀ korrekte Lagerung? ggf. Hersteller wechseln
- Färbegeschirr ◀ Einfluss von Reinigungsmitteln?
- Stammlösungen ◀ überschrittenes Haltbarkeitsdatum? ggf. Hersteller wechseln
- Konzentration der Gebrauchslösungen
- Färbezeiten/Entfärbezeiten
- Eindeckmittel

- Ungeeignete Kunststoff-Versandbehälter, die Lösungsmittel ausdünsten

Objektive Überprüfung durch Farbmessung

Zusätzlich zu der subjektiven visuellen Überprüfung der Färbung (Abschnitt Subjektive visuelle Überprüfung) kann die Farbgebung in Fotografien ausgemessen und dadurch objektiviert werden. Präparate für *virtuelle Mikroskopie*, für *elektronische Atlanten* und für die *Qualitätskontrolle* (z.B. Ringversuche) sollen immer visuell und objektiv überprüft werden. Für die Farbmessung sind eine spezialisierte technische Ausstattung und spezialisierte Computer-Software erforderlich. Die Einrichtung eines entsprechenden Service z.B. durch die Ringversuchsorganisationen ist derzeit in Diskussion (ggf. Kontaktaufnahme mit T. Binder).

Das Verfahren der Kolorimetrie und damit erhobene Daten an „Standard-Präparaten“ werden separat publiziert (in Vorbereitung).

Fotografische Beispiele mit korrekter und falscher Färbung

Die nachfolgenden Fotografien wurden mit einer digitalen Spiegelreflex-Kamera (*Canon EOS 1Ds* bzw. *1Ds MK3*) an einem *Zeiss-Mikroskop* (Axioskop 1) unter striktem Farbmanagement aufgenommen, aus den Rohdaten-Bildern entwickelt und nicht nachbearbeitet. Alle Fälle wurden mit diesem Standard-Protokoll gefärbt; bei den *abnormen* Fällen kamen falsche Antikoagulation, falsche Fixation, verspätet ausgeführte Färbung oder Alterung der Färbelösungen als negativer Einfluss hinzu (vgl. Abschnitt Färbeartefakte).

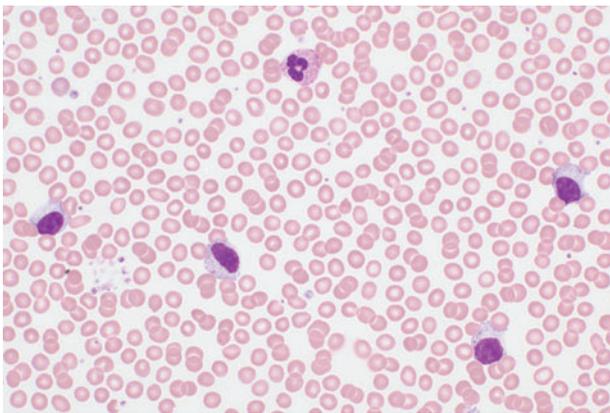


Abbildung 3 Korrekte Färbung: Blutausstrich eines Patienten mit T-LGL-Leukämie; Details siehe Abbildung 4.

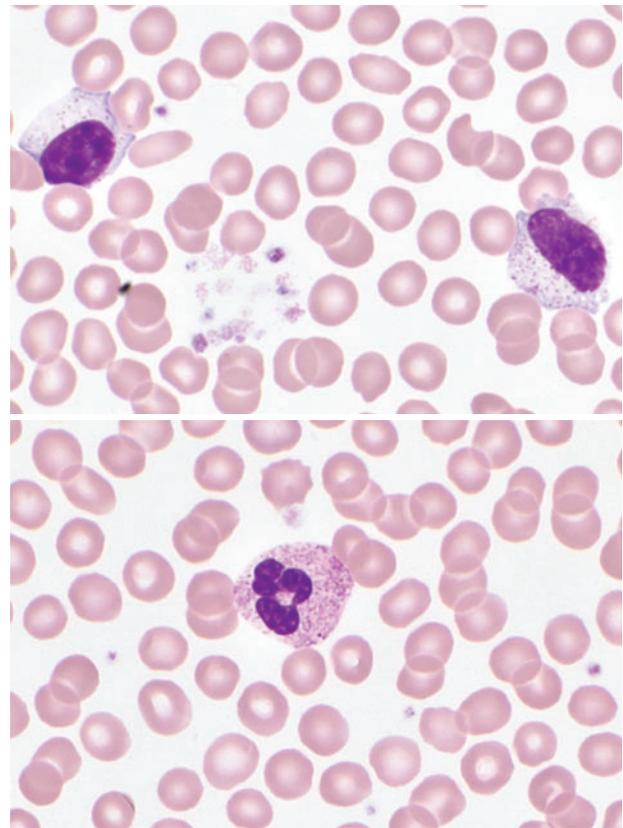


Abbildung 4 Korrekte Färbung: Blutausstrich eines Patienten mit T-LGL-Leukämie, Details aus Abbildung 3; oben und unten: gering gelb gefärbter Hintergrund, rot bis rot-gelb gefärbte Erythrozyten, rot-blaue Kerne, rein blaue basophile Zytoplasmata, Granula des Granulozyten und der Lymphozyten und der Thrombozyten kräftig gefärbt, Hyalomer der Thrombozyten leicht blau.

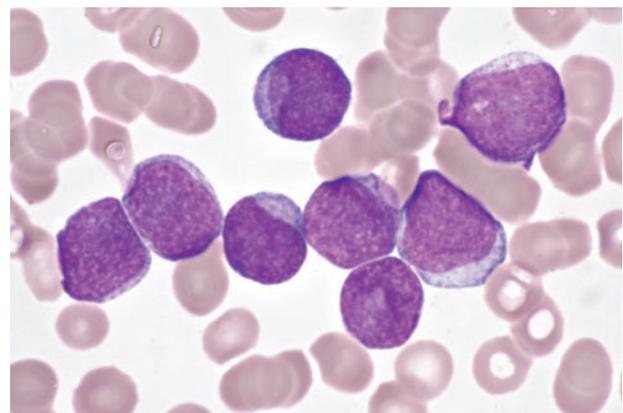


Abbildung 5 Korrekte Färbung: Mittelgradig dicht gepacktes aber sehr feines retikuläres Chromatin der Blasten (akute myeloische Leukämie), ohne Verklumpung detailliert abgebildet, Nukleolen nicht prominent.

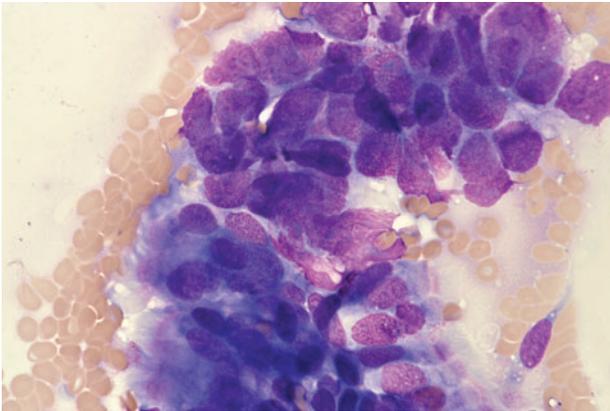


Abbildung 6 Korrekte Färbung: Organzytologie – Bronchialbürstenzytologie; unten normales Flimmerepithel, oben nicht-kleinzelliges Karzinom; Färbung in dichten Bereichen gleich intensiv wie in dünnen Bereichen, Darstellung der Gewebestruktur ausreichend, aber nicht so gut wie bei der in der Organzytologie parallel verwandten *Papanicolaou*-Färbung.

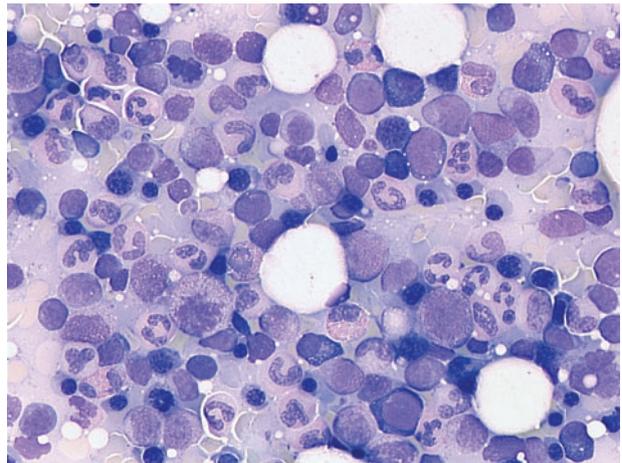
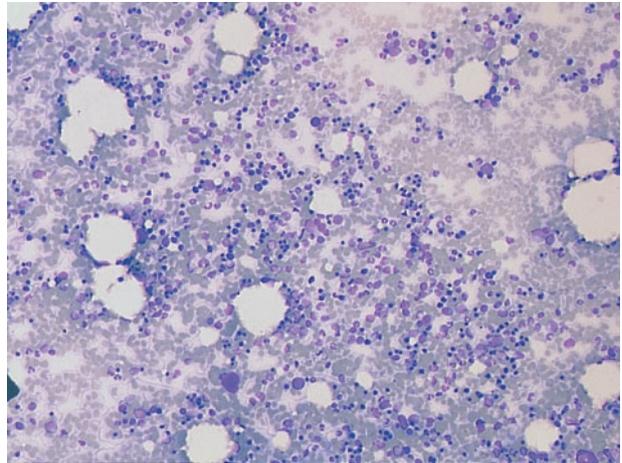


Abbildung 8 Artefakt durch vorherige Fixation mit Aldehyden (Formaldehyd, Glutaraldehyd), Veränderung hier nur milde ausgeprägt: Rot-Töne vermindert, schlechte Darstellung der Granula (hier: Kontamination mit Formaldehyd).

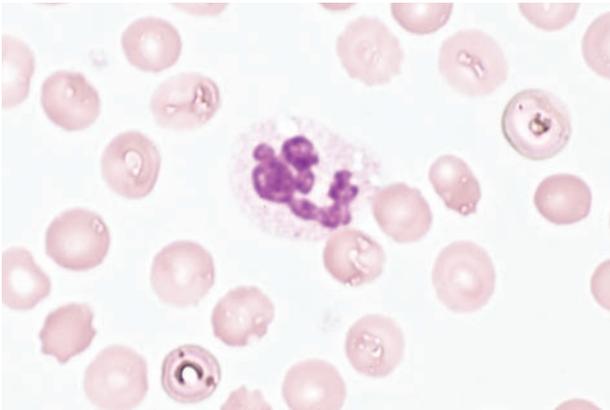


Abbildung 7 Alte vs. frische Färbung, gleichzeitig angefertigte Ausstriche vom selben Fall;
oben: Mit 48 Stunden alter Färbung (Methanol, Farblösungen und Puffer): Erythrozyten verformt mit „Kristallen“ (wegen verwässertem Methanol), Kern und Zytoplasma schwach gefärbt, Thrombozyten kaum sichtbar; **unten:** Mit frischer Färbung: Erythrozyten unverformt, Zytoplasma, Kern und Thrombozyten gut gefärbt.

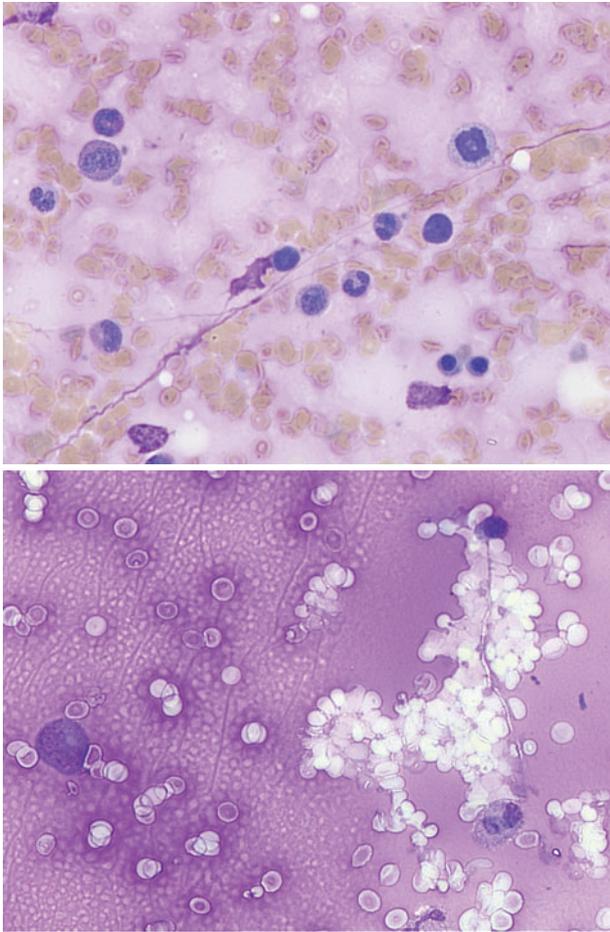


Abbildung 9 Artefakt durch Heparin: Hintergrund rot-violett, Zellen teils nur schemenhaft zu erkennen (Knochenmarksausstrich).

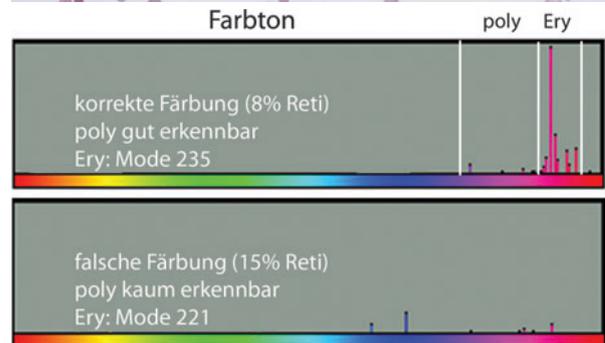
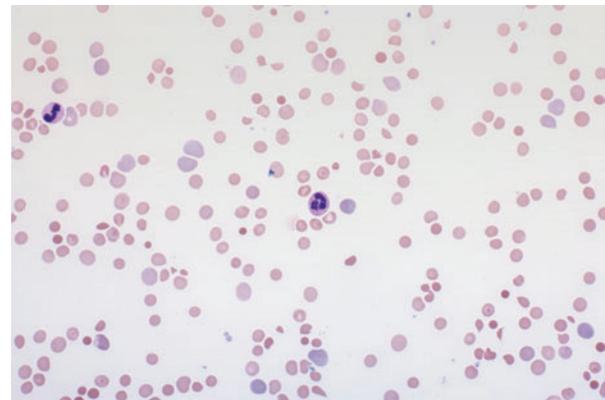
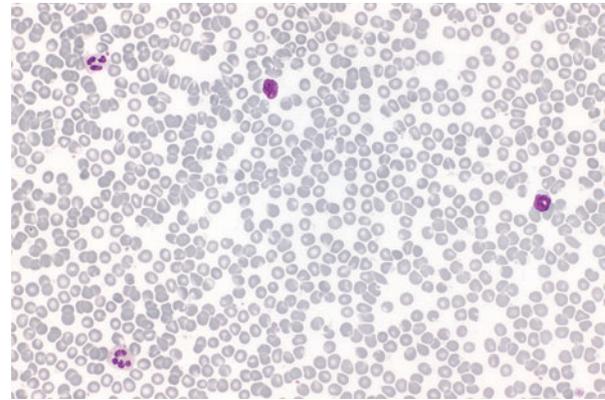


Abbildung 10 Verspätet vs. zeitgerecht gefärbtes Präparat; **oben**: Polychromasie bei verspäteter Färbung trotz erheblicher Retikulozytose kaum erkennbar, alle Erythrozyten graublau, Rot-Töne der Erythrozyten stark vermindert; **mitte**: korrekte Färbung, Polychromasie gut erkennbar (anderer Fall); **unten**: von diesen Fällen Darstellung der Farbspektren der orthochromatischen (Ery) bzw. polychromatischen (poly) Erythrozyten; **oberer Teil**: Fall mit zeitgerechter Färbung: 8% Retikulozyten, gut abgegrenzte Population roter Farbtöne der ortho-chromatischen Erythrozyten; **unterer Teil**: Fall mit verspäteter Färbung: 15% Retikulozyten, die orthochromatischen Erythrozyten bilden keine abgegrenzte Population roter Farbtöne aus, Farbverschiebung weit ins blaue.

Danksagung: Die Autoren danken den technischen Assistentinnen für hervorragende hämatologische Laborarbeit – insbesondere Frau J. Angermund und Frau B. Schossow–, den Kollegen für die kritische Begleitung bei der Erstellung dieser Publikation–insbesondere Frau F. Schwartz–und den Kollegen des Arbeitskreises

Laboratorium der DGHO für die Unterstützung dieses Projekts.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

1. Krafts KP, Pambuccian SE. Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. *Biotech Histochem* 2011;86:82–93.
2. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch Microsc Anat* 1877;13:263–78.
3. Ehrlich P. Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch Anat Phys* 1879;3:571–9.
4. Laveran CLA. A new parasite found in the blood of malarial patients. Parasitic origin of malarial attacks. *Bull Mem Soc Med Hosp Paris* 1880;17:158–64.
5. Chenzinsky CI. Zur Lehre über den Mikroorganismus des Malariafiebers. *Centralbl Bakteriologie* 1888;15:457–60.
6. Plehn F. Zur Ätiologie der Malaria. *Berl Kl Wochschr* 1890;27:292–4.
7. Malachowsky E. Zur Morphologie des Plasmodium Malariae. *Centralbl Klin Med* 1891;31:601–3.
8. Romanowsky DL. Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. *St Peters Med Wochenschr* 1891;16:297–303 and 309–15.
9. Nocht B. Zur Färbung der Malariaparasiten. *Centralbl Bakteriologie* 1898;24:839–44.
10. Giemsa G. Färbemethoden für Malariaparasiten. *Centralbl Bakteriologie* 1902;31:429–30.
11. Pappenheim A. Zur Blutzellfärbung im klinischen Blut-trockenpräparat und zur histologischen Schnittpräparatfärbung der hämatopoetischen Gewebe nach meinen Methoden. *Folia Haematologica* 1912;13:339–45.
12. Jenner L. A new preparation for rapidly fixing and staining blood. *The Lancet* 1899;153:370–1.
13. May R, Grünwald L. Über Blutfärbungen. *Centralbl Inn Med* 1902;11:1–6.
14. Marshall PN, Galbraith W, Navarro EF, Bacus JW. Microspectrophotometric studies of romanowsky stained blood cells; II. Comparison of the performance of two standardized stains. *J Microsc* 1981;124:197–210.
15. Wittekind DH. On the nature of the romanowsky-giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. *Histochem J* 1983;15:1029–47.
16. ICSH. ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by Azure B and Eosin Y (Romanowsky Stain). *Brit J Haemat* 1984;57:707–10.
17. Marshall PN, Bentley SA, Lewis SM. A standardized romanowsky stain prepared from purified dyes. *J Clin Pathol.* 1975;28:920–3.
18. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.
19. Marshall PN, Galbraith W. Colorimetry for the stain technologist. I. The specification of color. *Stain Technol* 1984;59:225–41.
20. Marshall PN, Galbraith W. Colorimetry for the stain technologist. II. The specification of chromaticity difference. *Stain Technol* 1984;59:273–90.
21. Marshall PN, Galbraith W. Colorimetry for the stain technologist. III. The specification of color difference. *Stain Technol* 1984;59:343–52.
22. Galbraith W, Marshall PN. Colorimetry for the stain technologist. IV. Analysis of the components of color difference. *Stain Technol* 1985;60:239–45.
23. Horobin RW. How romanowsky stains work and why they remain valuable – including a proposed universal romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem* 2011;86:36–51.
24. Woronzoff-Dashkoff KK. The Wright-Giemsa stain. Secrets revealed. *Clin Lab Med* 2002;22:15–23.
25. Marshall PN. Romanowsky-type stains in haematology. *Histochem J* 1978;10:1–29.
26. Pischinger A. Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1926;3:169–97.