

C. Rezepte und Chemikalien

Objektyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **16 (1959)**

Heft (6): **Erreger und Überträger tropischer Krankheiten**

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

C. Rezepte und Chemikalien

Desinfektion

Desogen (GEIGY)

Die käufliche Stammlösung (10%) tötet in einer Verdünnung von 1 : 20 (0,5%) die meisten Protozoen und Bakterien sofort ab. Desogen eignet sich sehr gut zum Desinfizieren von Glaswaren, Pipetten, Objektträgern, Instrumenten etc., die mit infektiösem Material in Berührung gekommen sind, sowie zur Desinfektion der Hände. Neuerdings kommt Desogen auch in Pulverform (Desogen fest) in den Handel, was den Transport über große Distanzen, speziell auch in den Tropen, erleichtert. Desogen fest wird in Wasser gelöst (1 g in 200 cm³ entspricht der oben angegebenen Konzentration).

Merfen

ist speziell gegen Verunreinigungen mit Pilzsporen wirksam. Zur Desinfektion der Haut wird die im Handel erhältliche Stammlösung von Merfen etwa 1 : 20 verdünnt, zum Desinfizieren von Laboratoriumstischen, Brutschränken und dergleichen verwendet man mit Vorteil die unverdünnte Stammlösung. Vgl. auch das Imprägnieren von Papier mit Merfen (S. 384).

Nipagin

Nipagin ist ein Fungizid, das, gewissen Kulturmedien zugesetzt, schon in Konzentrationen von 0,075% bis 0,15% wirksam ist. Statt Nipagin verwendet man neuerdings Methylum oxybenzoicum oder noch besser eine Mischung von Methylum oxybenzoicum mit Nipasil (Propylum paraoxybenzoicum). Die Konzentration muß für jedes Objekt ausgetestet werden, z. B. Endkonzentration von Meth. oxybenz. 0,15% und Nipasil 0,1%.

Paradichlorbenzol

Dies ist ein leicht flüchtiges Atemgift für Insekten. Das kristalline Pulver kann zum Schutz gegen Insektenfraß z. B. in Sammlungskästen oder Versand-schachteln eingelegt werden, wobei darauf zu achten ist, daß die Behälter gut verschlossen sind und das Paradichlorbenzol periodisch erneuert wird. Für das Arbeiten im Felde ist dieser Stoff wegen seiner Flüchtigkeit weniger geeignet (S. 384).

Thymol

Gewissen Lösungen (wie Eiweißglycerin, Puffer-Stammlösungen) werden einzelne Thymolkristalle zugesetzt, um das Wachstum von Mikro-Organismen zu verhindern.

Narkotika

(Zum Immobilisieren oder Abtöten von Arthropoden)

Aether

Die Insekten werden in ein gut verschließbares Gefäß gebracht und ein mit Aether getränkter Wattebausch zugegeben. Je nach Länge des Aufenthaltes im Narkotisiergefäß werden die Insekten nur vorübergehend immobilisiert oder getötet. Die Dauer der Behandlung variiert sehr für die verschiedenen Arthropodenarten. Das Strecken und Steifwerden der Beine ist meist ein Zeichen dafür, daß der Tod eingetreten ist.

Chloroform

Dieses kann wie Aether angewendet werden, aber nur zum Abtöten. Chloroform ist zur Narkose von Insekten nicht geeignet.

Cyankali

In Weithalsflaschen gibt man 2—3 Brocken festes Cyankali, bedeckt sie mit Gips, legt ein Filtrierpapier obenauf und verschließt die Flaschen gut mit einem Gummizapfen. Die Insekten werden zum Abtöten in diese Flaschen verbracht, welche längere Zeit benutzt werden können. Sehr geeignet für Arbeit im Felde.

Komprimierte Kohlensäure (aus Bombe)

Ein sehr gutes Narkosemittel für Insekten, da auch bei wiederholter Anwendung keine Schädigungen auftreten. Man schließt mit Hilfe eines Gummischlauches eine Pipette an die Kohlensäure-Bombe an und leitet den Strahl direkt auf das betreffende Insekt. Dauer der Narkose ca. $\frac{1}{4}$ Stunde, hängt jedoch von der Insektenart ab und muß jeweils ausprobiert werden. Zu starke Dosen wirken auch hier tödlich.

Tabakrauch

Dieser kann als Notbehelf im Felde zum Abtöten vor allem von Mücken und anderen kleinen Dipteren angewendet werden. Man verbringt die Insekten in ein verschließbares Glasgefäß und bläst je nach Größe 2—3mal Rauch dazu. Mücken sterben innert weniger Minuten.

Isotonische Lösungen

Es folgt hier eine kurze Zusammenstellung der wichtigsten isotonischen Lösungen, wie sie zum Sezieren und Untersuchen von Arthropoden- und Säugerorganen sowie zum Verdünnen von Blut und Serum verwendet werden.

Bei RINGER-, TYRODE- und LOCKE-Lösung empfiehlt sich die Verwendung von pro analysi-Substanzen, da bei anderen Reinheitsgraden der Salze oft Ausfällungen auftreten.

Glukoselösung

Glukoselösung 4% eignet sich gut zum Feuchthalten von Arthropodenorganen beim Sezieren, während Salzlösungen sich bei späterer histologischer Verarbeitung oft ungünstig auf die Färbung auswirken.

Locke-Lösung (modifiziert für Insekten)

Natriumchlorid (NaCl) 7%	20 cm ³
Kaliumchlorid (KCl) 1%	4 cm ³
Calciumchlorid (CaCl ₂) 1%	4 cm ³
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃) 10%	0,4 cm ³
dest. Wasser	ad 200 cm ³

Falls die LOCKE-Lösung sterilisiert werden soll, darf das Natriumbicarbonat erst nachträglich zugesetzt werden, da sich sonst wasserunlösliches Calciumcarbonat bildet.

Natriumcitrat

Natriumcitrat 3,8% wird zur Verhinderung der Blutgerinnung verwendet.

Zum Sezieren von Insekten wird diese Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, z. B. im Verhältnis 1 : 1. Gewisse Mikroorganismen, wie Spirochaeten, können jedoch bei längerem Verweilen in dieser Lösung inaktiv werden.

Physiologische Kochsalzlösungen

Für Mensch und Säuger	0,9%
Für Insekten	0,6—0,7%

Man stellt am besten 10-fach konzentrierte Stammlösungen her, da diese sich unbeschränkt halten, während in den gebrauchsfertigen Lösungen leicht Mikroorganismen wachsen.

Ringer-Lösungen

Insekten-Ringer I: (nach PRINGLE)	NaCl 0,54 M (= 3,15%)	290 cm ³
	KCl 0,54 M (= 4,03%)	5 cm ³
	CaCl ₂ 0,36 M (anhydricum = 4,0%) (CaCl ₂ + 6 H ₂ O = 7,88%)	5 cm ³
	dest. Wasser	ad 1000 cm ³
Insekten-Ringer II: (nach EPHRUSSI)	NaCl (10%)	75 cm ³
	KCl (1%)	35 cm ³
	CaCl ₂ anhydricum (1%)	21 cm ³
	dest. Wasser	ad 1000 cm ³
Säuger-Ringer:	NaCl (10%)	80 cm ³
	KCl (1%)	20 cm ³
	CaCl ₂ anhydricum (1%)	20 cm ³
	NaHCO ₃ (10%)	2 cm ³
	dest. Wasser	ad 1000 cm ³

Tyrode-Lösung

(nach LEHMAN und PAFF 1942)

NaCl (10%)	80 cm ³
KCl (1%)	20 cm ³
CaCl ₂ (anhydricum 1%)	20 cm ³
MgCl ₂ (+6H ₂ O 1%)	10 cm ³
NaH ₂ PO ₄ (1%)	5 cm ³
NaHCO ₃ (10%)	3 cm ³
Glukose	1 g
dest. Wasser	ad 1000 cm ³

Das pH dieser Lösung liegt bei 7,4.

Aufbewahren und Versand von Insekten

Insekten müssen, je nachdem sie für Bestimmungs- oder histologische Zwecke Verwendung finden sollen, verschieden behandelt werden.

a) Trocken

Verschiedene Insekten können nach Fixierung in Alkohol oder Formol nicht mehr für Bestimmungszwecke verwendet werden, da charakteristische Pigmentierungen und Zeichnungen dabei verlorengelassen (*Glossinen, Anophelen*). In solchen Fällen ist trockenes Aufbewahren zu empfehlen. Die frisch abgetöteten Tiere werden gut getrocknet (z. B. unter einer Glühlampe) und dann sorgfältig zwischen gefaltetes Seidenpapier oder Zellstoff eingelegt, wobei Beine, Flügel, Palpen usw. möglichst so angeordnet werden, daß die für die Bestimmung wichtigen Partien (Flügelbeschuppung, Tarsenfärbung) gut sichtbar sind und die verschiedenen Körperanhänge nicht abbrechen können. In dieser Weise muß auch die Verpackung vor sich gehen. Die zwischen Papier liegenden Insekten kommen in eine Schachtel, deren Boden sorgfältig mit einigen Lagen Zellstoff gepolstert wurde. Sie werden, unter Vermeidung von starkem Druck, dicht übereinandergelegt, damit die Schachtel beim Transport schüttelfrei bis oben ausgefüllt wird. Günstig sind Schachteln mit Schiebdeckel, wie Streichholzschachteln; Datum und Fundort sind zu vermerken. Es ist zu empfehlen, das zur Verpackung verwendete Papier zum Schutz gegen Schimmel und Insektenfraß vorher zu imprägnieren. Es wird hierzu mit einer Mischung von Merfen + DDT (10%) getränkt und dann getrocknet. Auch festes Paradichlorbenzol kann zur Not verwendet werden (vgl. S. 381).

Nach einer anderen Methode, die aber viel mehr Platz beansprucht, werden die betreffenden Insekten mit einer feinen Insektennadel aufgespießt, die an einem kleinen Kork- oder Kartonstückchen befestigt ist. Dieses Stückchen Kork oder Karton wiederum wird mit einer Stecknadel an der Unterseite eines Korkstopfens befestigt, der genau auf eine kleine Glastube paßt. Die Weite der Tube muß so gewählt werden, daß das befestigte Insekt nirgends anstößt.

b) Feucht fixiert

Die Gefäße, in denen fixierte Insekten versandt werden, am besten Glastuben oder bei größeren Mengen Weithalsflaschen, müssen bis oben mit Flüssigkeit gefüllt sein, um Beschädigungen der Insekten zu vermeiden, die dann entstehen, wenn die Objekte durch eine Luftblase hin- und hergeworfen werden. Ein Papierstreifen, auf dem mit Bleistift oder Tusche alle wichtigen Daten vermerkt sind, sollte jedem einzelnen Gefäß beigegeben und dieses danach gut verschlossen werden; Korkzapfen paraffiniert man am besten durch kurzes Eintauchen in geschmolzenes Paraffin und dichtet sie mit Klebe-Streifen nach außen ab.

Herstellung von mikroskopischen Präparaten

Reinigen der Objektträger

Objektträger müssen vor Gebrauch sorgfältig gereinigt und entfettet werden. Neue Objektträger werden zum Entfetten in hochprozentigen Aethylalkohol oder noch besser in eine Mischung von Aether-Aethanol (1 : 1) eingelegt. Schon gebrauchte Objektträger müssen vorher gereinigt werden; am besten einlegen in Seifenwasser, abreiben, gut wässern und nachspülen mit destilliertem Wasser. Vor Gebrauch mit sauberem Lappen abreiben, um Staubschicht zu entfernen.

1. Peripheres Blut

a) Blutentnahme

Ohrläppchen oder Fingerbeere, bei Säuglingen evtl. große Zehe mit Alkohol (95%) desinfizieren. Erst wenn die Haut vollständig trocken ist, mit scharfem Instrument (Nadel, Feder, Lanzettmesserchen, Schnepper etc.) ca. 3 mm tief punktieren, damit ein freifließender Blutstropfen austritt. Wird das Stechinstrument an einem Korkzapfen befestigt und in eine kleine Flasche mit Alkohol (95%) eingetaucht, kann es jederzeit transportiert und sofort benutzt werden.

b) Nativpräparat

Ein etwa stecknadelkopfgroßer Blutstropfen wird mit dem Objektträger abgenommen, mit einem kleinen Tropfen isotonischer Natriumcitratlösung (3,8%) vermischt, mit einem Deckglas eingedeckt und sofort beobachtet. Je nach Erregerart absuchen bei starkem Abblenden, oder noch besser mit Hilfe von Dunkelfeld (spez. *Spirochaeten*) oder Phasenkontrast (z. B. *Plasmodien*, *Trypanosomen* etc.).

c) Blutausstrich und «Dicker Tropfen» (Fig. 17)

Zur Darstellung der Parasiten im peripheren Blut bedient man sich der Methode des Blutausstreiches oder des dicken Tropfens. Im Ausstrich wird das Blut zu einem dünnen, durchsichtigen Film ausgebreitet, in welchem die einzelnen Blutzellen in einer Schicht nebeneinander liegen. Dabei kommt nur eine relativ geringe Blutmenge zur Untersuchung, doch bleiben Blutzellen und Parasiten unbeschädigt erhalten, so daß ein genaues Studium der einzelnen Formen möglich ist.

Die Technik des dicken Tropfens eignet sich für diagnostische Zwecke, wo Zeit gespart werden muß. Sie geht darauf aus, eine möglichst große Blutmenge auf kleinstem Raum mikroskopisch untersuchen zu können. Nach dieser Methode kann in derselben Zeit bis 50mal mehr Blut kontrolliert werden als im Blutausstrich, was auch bei geringer Parasitendichte eine relativ sichere und rasche Diagnose erlaubt. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß der mehrschichtige Blutbelag des dicken Tropfens haemolysiert werden muß, um die für die mikroskopische Betrachtung notwendige Durchsichtigkeit zu erhalten. Bei der Haemolyse werden aber Blutkörperchen und Parasiten vielfach deformiert, wodurch auch dem Geübten eine sichere Unterscheidung der verschiedenen Parasiten-Arten (z. B. *Plasmodien*) sehr erschwert wird. Es empfiehlt sich deshalb, bei jeder Blutuntersuchung auf Parasiten beide Methoden gleichzeitig anzuwenden, entweder auf 2 verschiedenen oder bei Massenuntersuchungen am besten auf dem gleichen Objektträger (sog. kombinierte Präparate; Fig. 17 rechts). Für jede Diagnose sollten im Minimum gleichzeitig zwei Präparate angefertigt werden, und dies wiederholt an verschiedenen Tagen und zu verschiedenen Tageszeiten; bei *Filarien* z. B. auch nachts, um nocturne Formen, wie *Wuchereria bancrofti*, nachzuweisen.

Herstellung des Blutausstriches

Ein kleiner, stecknadelkopfgroßer Blutstropfen (der erste, oft mit Gewebesaft verdünnte, wird abgewischt) wird mit einem Objektträger — ohne die Haut zu berühren — sorgfältig abgenommen und mit einem zweiten Objektträger oder einem geschliffenen Deckglas ausgestrichen. Der Ausstrich soll zwei Drittel des Objektträgers bedecken, ein Drittel wird für den dicken Tropfen reserviert.

Objektträger horizontal in der linken Hand halten und mit der rechten Hand die Schmalseite des Ausstrichglases in einem Winkel von etwa 45° auf

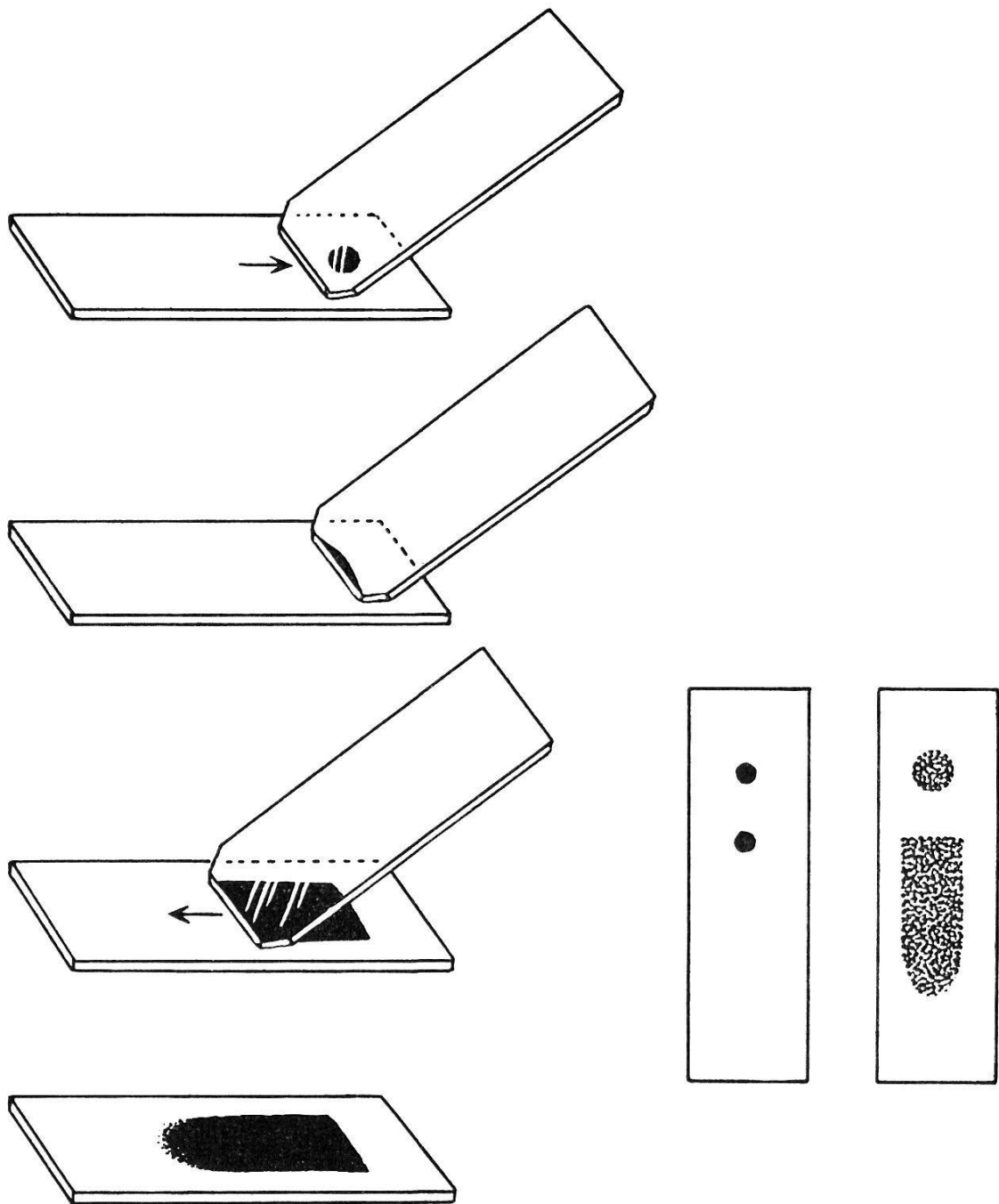


Fig. 17

Herstellung eines Ausstrichs und eines dicken Tropfens
(Vgl. Text)

Technique du frottis et de la goutte épaisse

Technique of Thick and Thin Blood Films

den Objektträger aufsetzen und sorgfältig an den Rand des Blutropfens heranzuführen (siehe Fig. 17). Man wartet, bis das Blut sich längs der Kante des Ausstrichglases verteilt hat, und zieht dieses dann langsam und gleichmäßig über den Objektträger hin. Wichtig ist, daß der Tropfen nicht zu groß ist, damit das Ende des Ausstriches auf dem Objektträger Platz hat. Dies gilt auch für die seitlichen Ränder, da sich die Parasiten vorwiegend an den Randpartien und am dünnen Ende des Ausstriches ansammeln. Es ist deshalb zweckmäßig, zum Ausstreichen einen Objektträger zu benutzen, bei welchem durch Abschneiden oder Abbrechen der Ecken die Ausstrichkante verkürzt wurde. Ferner sind geschliffene Objektträger zu empfehlen, da sie der Unterlage besser anliegen und dadurch gleichmäßigere und dünnere Ausstriche ergeben. Gewöhnliche Objektträger kann man selbst mit Sandstein abschleifen. Zum Ausstreichen eignen sich auch gut Deckgläser von Blut- oder Liquorzählkammern.

Im Idealfall sollte der ganze Blutfilm nur aus einer Zellschicht bestehen und bei normaler Luftfeuchtigkeit in wenigen Minuten trocken sein. Die Bezeichnung und Datierung der Präparate kann mit einem Schreibdiamanten am Rand des Objektträgers, am einfachsten aber mit einem spitzen Bleistift an der dicksten Stelle des Ausstriches eingekratzt werden.

Herstellung des «Dicken Tropfens»

Mit dem freien Drittel desselben Objektträgers (die Kombination mit dem Ausstrich ist natürlich nicht obligatorisch, hat sich aber für diagnostische Zwecke sehr bewährt) werden ein größerer oder mehrere kleine Blutropfen abgenommen, der Objektträger horizontal gehalten und das Blut mit einer Ecke des Ausstrichglases zu einem runden Fleck ausgebreitet. Durch einen richtig ausgebreiteten dicken Tropfen sollte Druckschrift eben noch lesbar sein. Zu dicke Tropfen splitteln leicht ab und lassen sich schlecht anfärben, zu dünne reichern spärliche Parasiten nicht genügend an. An der Luft trocknen lassen (ohne Erwärmen!). Trocknungsdauer je nach Klima $\frac{1}{2}$ bis 24 Stunden. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Präparate vor Staub und Fliegen geschützt sind. Fliegen setzen sich mit Vorliebe auf Ausstriche und dicke Tropfen und lecken mit ihrem Rüssel die roten Blutkörperchen auf; mit dem Staub können, besonders in den Tropen, Bakterien und Pilzsporen auf die Blutschicht gelangen und die Diagnose erschweren.

2. Organe

a) Ausstrichpräparat

Von Material, welches durch Lumbal-, Leber- oder Milzpunktion gewonnen wurde, können ebenfalls Ausstriche hergestellt werden. Lumbalpunktat kann wie Blut ausgestrichen werden. Milz- oder Leberpunktat wird mit einer Platinöse oder einem Spatel zu einer möglichst dünnen Schicht verstrichen. So gewonnene Präparate können nach Trocknen wie Blutausstriche fixiert (S. 388) und gefärbt werden.

b) Tupf- und Quetschpräparate

Zum Nachweis von Parasiten in Organen und Geweben (Biopsie- und Autopsiematerial) kann die zeitraubende Herstellung von Schnittpräparaten umgangen werden. Je nach Konsistenz des Organes lassen sich Tupf- oder Quetschpräparate herstellen. Der Aufbau der Organe ist in diesen Präparaten nicht mehr erkennbar, aber die Parasiten bleiben gut erhalten. Diese Methode hat noch den Vorteil, daß man die beim Einbetten stets erfolgende Schrumpfung

der Zellen vermeiden und die gleichen Färbemethoden wie im Blutaussstrich anwenden kann.

Zur Herstellung von *Tupfpräparaten* (besonders geeignet für Organe wie Milz und Leber) verwendet man kleine Gewebestücke von ca. 5 mm Durchmesser. Die frische Schnittfläche wird einige Male auf Filtrierpapier abgetupft, um überschüssiges Blut zu entfernen, wobei man das Gewebestückchen am besten mit einer anatomischen Pinzette festhält. Anschließend *leichtes* Auftupfen auf entfetteten Objektträger; man setzt am besten mehrere Tupfen nebeneinander. Nicht stark pressen, da die Zellen sonst zu sehr deformiert werden! Trocknen lassen, 3 Minuten mit Methylalkohol fixieren und wie Blutausstriche färben.

Von relativ weichen Organen, die keine schönen Tupfpräparate ergeben, z. B. Hirn und Knochenmark, können *Quetschpräparate* hergestellt werden. Ein etwa 5 mm³ großes Gewebestückchen wird zwischen zwei entfettete Objektträger gebracht, die man stark zusammenpreßt und dann rasch übereinandergleitend auseinanderzieht. Man erhält gleichzeitig zwei relativ dünne Ausstriche, die wie Blutpräparate weiterbehandelt werden können.

Aufbewahren und Versand der Präparate

Zum *Aufbewahren* und *Verschicken* ungefärbter Präparate eignen sich auch in den Tropen am besten die folgenden Methoden: Für Ausstriche ist, falls möglich, eine Fixierung in Methylalkohol (wenn nicht vorhanden, auch in Äthylalkohol 100%, S. 392) die beste Garantie, da dann auch nach Monaten noch eine befriedigende Färbung gelingen kann. Aber auch unfixierte, trockene Ausstriche können, wenn man je zwei Präparate Schicht auf Schicht, dicht mit Papier umwickelt, längere Zeit aufbewahrt und gut weiterverarbeitet werden. Dicke Tropfen werden zu längerer Aufbewahrung zweckmäßig nach dem Antrocknen mit destilliertem Wasser haemolysiert und dann fixiert. Für alte Präparate, die sich meist stark blau überfärben, empfiehlt GIEMSA die nachträgliche Differenzierung mit NaH₂PO₄ (s. S. 400).

c) Schnittpräparate

Zur Darstellung der genauen Lage der Parasiten in den verschiedenen Organen werden am besten Paraffinschnitte hergestellt. Das hierzu verwendete Material sollte möglichst rasch fixiert werden. Die Wahl des Fixiermittels richtet sich meist nach der Färbung, mit der man später die verschiedenen Parasiten darstellen möchte. Falls bei den spezifischen Färbungen nichts anderes vermerkt ist, sind besonders CARNOY und DUBOSCQ zu empfehlen. Genaue Angaben über Einbetten und Herstellen von Schnitten finden sich in Spezialwerken wie LANGERON (Paris 1942), ROMEIS (München 1948) etc.

3. Kotausstriche

a) Nativpräparat

Mit Holzstäbchen oder Platinöse wird eine ca. stecknadelkopfgroße Stuhlmenge resp. Kulturmateriale auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas zugedeckt. Deckglas leicht anpressen, damit das Präparat möglichst dünn wird. Je nach Konsistenz der Faekalien muß mit etwas physiologischer Kochsalzlösung oder Wasser verdünnt werden (s. auch S. 282 f.).

b) Dauerpräparat

Mit Holzstäbchen oder Platinöse wird wie für das Nativpräparat eine Kot- oder Kulturprobe auf einen entfetteten Objektträger gebracht und zu einer mög-

lichst dünnen Schicht ausgebreitet. Besonders schöne Präparate von *Amoeben* aus Kulturen erhält man nach der Methode von DOBELL, indem man Deckgläschen in die Kulturen einlegt, auf welchen sich die Trophozoiten ansammeln und herumkriechen.

Da die Feuchtfixierung (S. 282 und S. 394) die besten Resultate ergibt, muß man sorgfältig darauf achten, daß der Ausstrich in die Fixierflüssigkeit getaucht wird, sobald der Rand leicht angetrocknet, der Hauptteil aber noch feucht ist.

Da albuminfreies Material in Berührung mit der heißen SCHAUDINN'schen Lösung sich leicht ablöst, muß es entweder mit Serum vermischt oder auf Objektträger verbracht werden, welche mit Eiweißglycerin vorbehandelt wurden. Letztere Methode eignet sich auch zum Montieren dünner Epithelschichten von Schleimhautbiopsien.

Anreicherung zum Nachweis spärlicher Erreger

1. Im peripheren Blut

Zentrifugationsanreicherung

vor allem zum Nachweis von *Trypanosomen* und *Spirochaeten*.

5—10 cm³ Citratblut werden bei einer Tourenzahl von 1500/Minute während 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma mit den darin enthaltenen Leukocyten und Parasiten wird sorgfältig dekantiert und nochmals 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Wieder dekantieren und ein drittes Mal zentrifugieren: 15—20 Minuten bei einer Tourenzahl von 1800—2000/Minute. Das Sediment der 2. und 3. Zentrifugation wird sofort direkt beobachtet (*Trypanosomen* noch beweglich!). Es können auch Ausstriche hergestellt, mit Methylalkohol fixiert und nach GIEMSA gefärbt werden.

2. Im Lumbalpunktat

Zum Nachweis von *Trypanosomen* in späteren Stadien der Infektion wird häufig die oben beschriebene Zentrifugationsanreicherung auch für das Lumbalpunktat angewendet.

3. Im Kot: Anreicherung von Protozoencysten

Wir wählen aus den vielen, bewährten Rezepten, die sich zur Anreicherung von *Protozoencysten* wie auch gleichzeitig von *Helmintheneiern* eignen, die beste Methode für Routine-Arbeit in einem modern ausgerüsteten Laboratorium (a) und eine einfache Technik, die sich ohne Zentrifuge auch unter primitiven Verhältnissen (b) durchführen läßt.

a) Formalin-Triton-Aether-Zentrifugierung

(mod. nach MALDONADO)

- In einem graduierten Reagenzglas 5 cm³ Formol (10%) mit einem Tropfen «Triton NE» (Netzmittel, hergestellt durch ROHM und HAAS Company, Philadelphia, Pa.) vermischen.
- 1 cm³ Faeces zusetzen und mit einem Holzstäbchen oder Glasstab zu einer möglichst feinen Emulsion verrühren.

- Suspension durch 4 Lagen feiner Gaze in ein konisches 15 cm³-Zentrifugenglas filtrieren, wobei die Gaze im Trichter gut ausgepreßt werden soll.
- Dem Filtrat 5 cm³ Aether zusetzen, das Zentrifugenglas gut mit einem Gummizapfen verschließen und kräftig durchschütteln.
- 1 Minute bei einer Tourenzahl von 2000/Min. zentrifugieren.
- Über dem Sediment, an der Formol-Aether-Grenze bildet sich ein Detrituspfropf, welcher mit einem Holzstäbchen von der Glaswandung abgelöst werden muß. Darauf wird der ganze Detrituspfropf mit der überstehenden Flüssigkeit abgegossen und die Innenwandung des Gläschens mit einer trockenen Gaze sorgfältig reingewischt.
- Das Sediment am Grunde des Gläschens wird danach mit einem (für quantitative Bestimmung genau abgemessenen) Tropfen physiologischer NaCl verdünnt und mit einer Pipette zur Untersuchung auf den Objektträger gebracht.

(Zur quantitativen Auswertung untersucht man immer dieselbe Menge pro Präparat, z. B. 0,075 cm³.)

Diese Methode hat gegenüber der üblichen, ebenfalls sehr guten *Z i n k s u l f a t - Z e n t r i f u g i e r u n g* den großen Vorteil, daß die zentrifugierten Proben nicht sofort, d. h. für *Protozoencysten* innerhalb einer Stunde, untersucht werden müssen, sondern daß das Konzentrationsgemisch gleichzeitig fixiert und somit das Material nach beliebiger Zeit verarbeitet werden kann.

b) Zucker-Flottier-Methode

- Emulgieren von 1 g Faeces in 3 cm³ Zuckerlösung in Zylinderglas.
- Glas bis zum Rande mit Zuckerlösung auffüllen, mit einem Stäbchen gut verrühren und die großen Detrituspartikeln herausfischen.
- Deckglas auf die Oberfläche der Zuckerlösung legen und während 20 Minuten dort liegen lassen.
- Deckglas mit der nassen Seite nach unten auf einen Objektträger bringen und untersuchen.

Für *Protozoencysten* ist bei beiden Methoden der Zusatz von LUGOL'scher Lösung zum fertigen Präparat zu empfehlen.

Fixierungsmittel

Aethanol (für Arthropoden geeignet)

(= Aethylalkohol 100 % oder absoluter Alkohol)

Alkohol kommt zum Fixieren in Konzentrationen von 70—85% zur Anwendung. Das Material kann in Alkohol fixiert und gleichzeitig unbeschränkt darin aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung muß der Alkohol regelmäßig nachgefüllt werden, da dieser auch bei gut abgeschlossenen Gefäßen mit der Zeit verdunstet.

In Sammlungen bewährt sich folgende Methode sehr gut: Die kleinen Glastuben, in welchen die einzelnen Objekte untergebracht sind, werden bis zum Rand mit Alkohol gefüllt und dann mit Watte verschlossen. Darauf werden eine Anzahl solcher Tuben in einem größeren Sammelgefäß, welches ebenfalls mit Alkohol gefüllt ist, Öffnung nach unten, eingestellt. Selbst wenn der Alkohol im Sammelgefäß bis auf eine geringe Bodenschicht verdunstet, sind doch die Objekte in den Glastuben vor Austrocknung geschützt. Bei dieser Anordnung genügt es, die Sammelgefäße zwei- bis dreimal jährlich nachzufüllen.

Carnoy

Absoluter Alkohol	60 cm ³
Chloroform	30 cm ³
Eisessig	10 cm ³

Die drei Lösungen werden unmittelbar vor Gebrauch gemischt. CARNOY dringt rasch in die Gewebe ein. Objekte von 1—2 mm Dicke sind schon nach einer Stunde, solche von 3—5 mm Dicke nach 3—5 Stunden fixiert. Nach der Fixierung können die Präparate direkt in absoluten Alkohol übertragen werden. Material, welches nicht sofort weiterverarbeitet werden kann, wird am besten in Alkohol 80% aufbewahrt.

Cova-Garcia (für Eier von Stechmücken)

Gummi arabicum pulv.	3 g
Formol: Kochsalzlösung (0,8%) 1:10	100 cm ³
Glycerin	2 cm ³

Die Eier werden aus Wasser direkt in diese Mischung übertragen (Alkohol erzeugt Schrumpfung, speziell der Schwimkkammern bei Anopheles-Eiern).

Duboscq

Alkoholische Pikrinsäure 0,75%	10 Teile
(Die Pikrinsäure wird in Alkohol 85% gelöst.)	
Formol 40%	4 Teile
Eisessig	1 Teil

Unmittelbar vor Gebrauch werden die drei Lösungen gemischt. DUBOSCQ eignet sich besonders zur Fixierung von schwer durchdringbaren Objekten (z. B. Arthropoden). Nach der Fixierung werden die Präparate in Alkohol 80—90% übertragen.

Entsublimieren

Bei der Fixierung mit sublimathaltigen Gemischen können Niederschläge entstehen, die am besten gleich nach der Fixierung entfernt werden, indem man die Präparate in einer alkoholischen Jod-Jodkali-Lösung auswäscht: Organstücke 30—60 Minuten, Ausstriche und Schnitte 10—20 Minuten.

Man setzt Alkohol 70—80% so viele Tropfen einer alkoholischen Jod-Jodkali-Lösung (z. B. LUGOL) zu, bis er eine kognakbraune Farbe zeigt. Anschließend wird in Alkohol 70% kurz ausgewaschen und mit Natriumthiosulfat 0,25% nachbehandelt zur Entfernung der Jodreste. Das Natriumthiosulfat wird mit Wasser ausgewaschen.

Formol

(für feinere histologische Untersuchungen wenig geeignet)

Zur Fixierung wird das käufliche Formol (= Formaldehyd 40%) mit Brunnenwasser verdünnt. Meist werden Verdünnungen von 1 : 3 (= 10%) oder 1 : 9 (= 4%) verwendet. In Lösung (4%) können Objekte lange Zeit aufbewahrt werden.

Formol, neutral

a) Man läßt Formol in einer braunen Flasche über einer 1—2 cm hohen Calciumcarbonat-Schicht mindestens 24 Stunden stehen, wobei man anfangs einige Male kräftig umschüttelt.

b) Neutralisieren mit Natronlauge (NaOH) oder Soda. Die Reaktion kann durch Zusatz von einem Tropfen Neutralrot (0,1%) oder mit Lackmus-Papier kontrolliert werden.

Neutrales Formol wird häufig zur Fixierung von Material verwendet, das später mit Silber imprägniert werden soll.

Helly

Stammlösung: Kaliumbichromat	2,5 g
Natriumsulfat	1 g
Sublimat	5 g
dest. Wasser	100 cm ³

100 cm³ der Stammlösung werden unmittelbar vor Gebrauch mit 5 cm³ Formol gemischt. Die Fixierungsdauer beträgt etwa 1—6 Stunden, anschließend muß mit Brunnenwasser gründlich ausgewaschen werden. Vor der Färbung muß das Material entsublimiert (S. 391) werden.

MacGregor (für Larven von Stechmücken)

Formol 4%	100 cm ³
Glycerin	2,5 cm ³
Borax	5 g
dest. Wasser	1000 cm ³

Die Larven werden in heißem Wasser abgetötet und dann sofort in obiges Gemisch übertragen. Dieses Medium verhindert das Ausfallen der für die Bestimmung wichtigen Borsten und Haare.

Methanol (= Methylalkohol)

Gebräuchlichstes Fixierungsmittel für Ausstrich-, Tupf- und Quetschpräparate, die später mit einem der ROMANOWSKY-Gemische gefärbt werden sollen. Ausstriche werden 3 Min. in Methanol gestellt oder mehrmals übergossen und an der Luft getrocknet.

M.I.F. (Merthiolate - Iodine - Formol)

nach SAPERO und LAWLESS (1953)

Zur Fixierung und Färbung von *Darmprotozoen*.

a) Kotausstriche

Stammlösungen: I. Merthiolat-Tinktur (No. 99, Lilly, 1 : 1000)
 II. LUGOL'sche Lösung 5%
 III. Formol 40%

Diese drei Stammlösungen werden gemischt im Verhältnis:

LUGOL	10—15 Teile
Formol	10—15 Teile
Merthiolat	ad 100 Teile

Je größer der Jodanteil, desto rascher färben sich die Präparate. Andererseits werden die Präparate bei langsamerer Färbung — mit etwas weniger Jod — schöner.

Man gibt auf einen Objektträger einen Tropfen der M.I.F.-Mischung und einen gleich großen Tropfen dest. Wasser, vermischt die beiden und setzt möglichst frischen Stuhl zu (nicht zuviel!). Evtl. kann man die Präparate mit Paraffin, Vaseline oder NOYER-Paste abdichten, damit sie nicht austrocknen.

b) Größere Kotproben

Stammlösungen: I. dest. Wasser	250 cm ³
Merthiolat (Lilly, 1 : 1000)	200 cm ³
Formol (40%)	25 cm ³
Glycerin	5 cm ³
Diese Lösung muß in einer braunen Flasche aufbewahrt werden.	
II. frische LUGOL'sche Lösung	5%

Die beiden Lösungen werden unmittelbar vor Gebrauch gemischt, z. B. 9,4 cm³ Stammlösung I mit 0,6 cm³ Stammlösung II pro 1 cm³ Faeces. Das Plasma färbt sich gelb bis rosa, die Kernsubstanz dunkelbraun bis schwarz. Die Stammlösungen sind einige Wochen haltbar, die Mischung dagegen höchstens 6–8 Stunden (wenn gut verschlossen).

Pampel's Flüssigkeit (für Fliegen und Mücken)

Eisessig	4 Teile
Formol 40%	6 Teile
Absoluter Alkohol (evtl. 96%)	15 Teile
Wasser	30 Teile

In dieser Lösung können die Insekten fixiert und aufbewahrt werden. Eine nachträgliche histologische Verarbeitung ist möglich.

Polyvinylalkohol = P.V.A. (für Darmprotozoen)

nach BROOKE und GOLDMANN (1949)

SCHAUDINN'sche Lösung (S. 394)	93,5 cm ³
Glycerin	1,5 cm ³
Eisessig	5 cm ³

Zu diesem Gemisch werden bei Zimmertemperatur 5 g pulverisiertes Elvanol DUPONT 90—25 zugesetzt. Dann wird unter stetem Umrühren langsam auf 75° C erwärmt, bis eine klare Lösung vorliegt. Die Fixierflüssigkeit ist nach Abkühlen auf Zimmertemperatur gebrauchsfertig und hält sich mehrere Monate.

Eine Probe möglichst frischen Kotes wird mit der doppelten bis dreifachen Menge PVA gut vermischt. Ausstriche können noch nach mehreren Monaten hergestellt werden. Ein Tropfen des fixierten Kotes wird auf einem entfetteten Objektträger dünn ausgebreitet und kann nach völligem Trocknen und Entsublimieren (S. 391) wie ein Frischpräparat gefärbt werden.

Regaud

Kaliumbichromat (3%)	4 Teile
Formol	1 Teil

Kurz vor Gebrauch werden die beiden Lösungen gemischt und während 4 Tagen fixiert, wobei die Lösung täglich erneuert wird. Anschließend gibt man die Objekte während 8 Tagen in Kaliumbichromat (3%) und wässert zuletzt noch 24 Stunden.

Diese etwas langwierige Fixierung gibt sehr gute Resultate für die Darstel-

lung gewisser Feinstrukturen bei späterer HEIDENHAIN-Färbung oder LEVADITI-Silberimprägnation (*Spirochaeten*, vgl. S. 402).

Schaudinn (für Darmprotozoen)

gesättigte, wäßrige Sublimatlösung	2 Teile
absoluter Alkohol	1 Teil
Eisessig	ca. 5 cm ³ auf 100 cm ³ Lösung

Unmittelbar vor Gebrauch werden die drei Lösungen gemischt und auf 60 bis 70° C erwärmt. Ausstriche werden feucht fixiert, nur der Rand sollte leicht angetrocknet sein, da sonst die Schicht gerne abschwimmt. Die nach unten gekehrten Präparate werden mit der heißen Lösung unterschichtet. Die Fixierungsdauer beträgt rund 20 Minuten. Anschließend werden die Präparate direkt in Alkohol 70% übertragen, in welchem sie unbeschränkte Zeit aufbewahrt werden können. Vor dem Färben müssen die Präparate entsublimiert (S. 391) und gut gewässert werden.

Färbungen

Gram-Färbung

Diese Färbung gibt eine spezifische Reaktion mit Lipoproteiden. GRAM-positive Bakterien färben sich blauschwarz, GRAM-negative dagegen rot an.

- | | | |
|-----------------------------------|--|-------------------------|
| I. Gentianaviolett-Stammlösung: | Gentianaviolett | 50 g |
| | Alkohol 96% | 500 cm ³ |
| II. Karbolwasser: | Alkohol 96% | 110 cm ³ |
| | Phenolum liquefactum | 110 cm ³ |
| | dest. Wasser | ad 1000 cm ³ |
| III. Gebrauchsfertige Farblösung: | Lösung I | 5 cm ³ |
| | Lösung II | 50 cm ³ |
| | dest. Wasser | 50 cm ³ |
| IV. LUGOL'sche Lösung: | Kaliumjodid (KJ) | 2 g |
| | dest. Wasser | 5 cm ³ |
| | zu dieser Lösung gibt man | |
| | Jod | 1 g |
| | dest. Wasser | ad 300 cm ³ |
| V. Fuchsin: | Stammlösung, gesättigt in Alkohol 96%, diese wird zum Gebrauch | |
| | 1 : 10 mit dest. Wasser verdünnt. | |

Ausführung der Färbung

- Färben mit Gentianaviolett (III) während 2—3 Minuten
- nach Abgießen direkt in LUGOL'sche Lösung, 2—3 Minuten
- LUGOL'sche Lösung abgießen
- überschüssige Farbe mit Alkohol 95%, evtl. mit Zusatz von 3% Aceton, entfernen
- mit Wasser spülen
- mit Filtrierpapier trocknen
- 30 Sekunden färben mit Fuchsin (V)
- mit Wasser spülen und trocknen

Hämatoxylin-Färbungen

Eine ganze Reihe von Hämatoxylin-Gemischen wird zur Darstellung der Kerne und Feinstrukturen verwendet. Das Gelingen der Färbungen hängt weitgehend von einer genauen Befolgung der Vorschriften und von der Qualität der Farbstoffe ab. Wir selbst haben mit Hämatoxylin-GEIGY (Basel) stets sehr gute Resultate erzielt.

Hämatoxylin zeigt in saurer Lösung einen rötlich-violetten, in alkalischer Lösung einen blauen Farbton. Nach der Färbung kann mit salzsaurem Alkohol differenziert werden (falls nichts anderes vermerkt), dann längeres Auswaschen mit fließendem Brunnenwasser, das meist leicht alkalisch ist und die Präparate bläut. Falls das Brunnenwasser nicht alkalisch genug ist, kann man einige Tropfen Ammoniak oder Soda zusetzen.

Als Gegenfärbung eignet sich sehr gut Eosin oder Erythrosin, z. B. in wäßriger Lösung (0,1%).

Carazzi (Hämalaun)

dest. Wasser	400 cm ³
Glycerin	100 cm ³
Kalialaun	25 g
Kaliumjodat (KJO ₃)	0,1 g
Hämatoxylin	0,5 g

Die Lösung darf nicht erwärmt, muß aber gut geschüttelt werden, bis alle Substanzen gelöst sind. Die Färbedauer beträgt je nach Alter der Lösung 10 Minuten bis einige Stunden. Überfärbte Präparate können mit salzsaurem Alkohol (HCl 0,5% in Alkohol 70%) differenziert werden.

CARAZZI wird häufig zur Darstellung von *Mikrofilarien* verwendet, da bei dieser Färbung (Gegenfärbung mit Eosin-Erythrosin) die Scheiden deutlich sichtbar werden. Sie eignet sich auch zur Färbung von Kotausstrichen mit Amöben (schnell und einfach).

DeLafield

Lösung I: Hämatoxylin 4 g
Aethanol 100% 25 cm³

II: Ammoniakalaun 40 g
dest. Wasser 400 cm³

Die Lösungen I und II werden gemischt und 3—4 Tage am Licht offen stehen gelassen. Dann wird die Farblösung filtriert und Lösung III zugesetzt:

III: Glycerin 100 cm³
Methanol 100 cm³

Nach einigen Tagen wird nochmals filtriert. Diese Stammlösung ist lange Zeit haltbar.

Zum Färben verdünnt man die Stammlösung mit destilliertem Wasser. Die Färbedauer hängt von der jeweiligen Verdünnung ab, sie beträgt z. B. 2—6 Minuten bei einer Verdünnung von 1 : 2.

DELAFIELD wird vor allem für Schnittpräparate verwendet (z. B. für Gewebeformen von *T. cruzi*), eignet sich aber auch zur Darstellung von *Mikrofilarien* in dicken Tropfen (differenzierte Färbung der Kerne) oder von *Plasmodien-Cysten* auf Mückendärmen (Totalpräparate).

Färbung von Cysten-Därmen mit Hämatoxylin-Delafield

Die Därme werden aus den Mücken in einen Tropfen physiologische Kochsalzlösung hineingezogen, 2 Tropfen DUBOSCQ zugegeben und 5 Minuten fixiert. Dann wird mit dest. Wasser ausgewaschen, das einige Male gewechselt werden muß, bis die Pikrinsäure entfernt ist (2—24 Stunden). Gefärbt wird 30—40 Minuten bei einer Verdünnung von 1 : 10, dann differenziert man kurz ($\frac{1}{2}$ bis 2 Minuten) in salzsaurem Wasser 1% und bläut 10—15 Minuten in Natriumcarbonatlösung 1%. Anschließend entwässern und eindecken mit Balsam.

Man benutzt am besten einen Satz von kleinen Uhr- oder Blockschalen und bringt die Cystendärme mit Hilfe eines feinen Glashakens von einer Lösung in die andere. (Siehe auch Silberimprägnation nach RIO HORTEGA S. 403.)

Faust

siehe HEIDENHAIN, *Modifikation nach FAUST*

Heidenhain (Eisenhämatoxylin)

Besonders zu empfehlen, vor allem für sämtliche Darmprotozoen und alle Feinstrukturen, jedoch etwas langwierig und heikel.

I: Eisenalaun-Beize:

Eisenalaun, krist.	10 g
dest. Wasser	100 cm ³

Die Eisenalaunkristalle müssen hellviolett sein und dürfen keine gelbliche Verfärbung aufweisen. Die Lösung sollte nicht erwärmt werden.

II: Hämatoxylinlösung:

Hämatoxylin	0,5 g
Aethanol 96%	10 cm ³

Sobald das Hämatoxylin sich ganz gelöst hat, werden 100 cm³ destilliertes Wasser zugesetzt. Diese Farblösung muß 4—5 Wochen reifen. Zum Färben verdünnt man 1 : 1 mit destilliertem Wasser. Nach Gebrauch kann die Farbe in eine braune Flasche zurückfiltriert und mehrmals verwendet werden.

Durch Zusatz von genau 0,1 g Natriumjodat (NaJO₃) zu der fertigen Stammlösung wird das Hämatoxylin künstlich gereift und sofort gebrauchsfertig.

Ausführung der Färbung

- Waschen in dest. Wasser (am besten mehrmals wechseln).
- Beizen in Eisenalaun 2,5% (6—24 Stunden).
- Spülen mit dest. Wasser (mehrmals wechseln).
- Hämatoxylin Heidenhain (6—24 Stunden, gleich lange wie Beizen).
- Kurz auswaschen in dest. Wasser.
- Differenzieren in Eisenalaun 2,5% (man kann die gleiche Lösung wie zum Beizen verwenden). Kontrolle unter dem Mikroskop.
- Wässern in fließendem Brunnenwasser, mindestens 10 Minuten.
- Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Balsam.

Die HEIDENHAIN'sche Methode kann auch als Schnellfärbung ausgeführt werden, indem man im Thermostat bei 37° C beizt und färbt, jeweils eine Stunde. Die Ausführung bei Zimmertemperatur gibt jedoch eine viel differenziertere Färbung der Strukturen.

Modifikation nach FAUST

Nach FAUST kann die Färbung noch schneller ausgeführt werden, indem man mit 2-prozentigem Eisenalaun 2 Minuten bei 40° C beizt und nach kurzem Auswaschen in Brunnenwasser 2 Minuten bei 40° C mit der unverdünnten Stammlösung färbt.

Mayer (saures Hämalan)

Hämatoxylin	1 g
dest. Wasser	1000 cm ³

Zu dieser Lösung gibt man

Natriumjodat (NaJO ₃)	0,2 g
Kalialaun, chem. rein	50 g

Man schüttelt mehrmals, bis alle Salze völlig gelöst sind, setzt dann

Chloralhydrat	50 g
Citronensäure, krist.	1 g zu.

Diese Farblösung ist gut verschlossen lange Zeit haltbar.

Schnitt- oder Ausstrichpräparate werden aus destilliertem Wasser in die Farbe gebracht und während 4—6 Minuten gefärbt, dann etwa 20 Minuten mit Leitungswasser ausgewaschen.

Da reines Natriumjodat oft nicht erhältlich ist, wird statt MAYER's Hämatoxylin heute meist die Formel nach CARAZZI oder DELAFIELD verwendet.

*Macchiavello-Färbung (zur Darstellung der Rickettsien)**Modifikation nach MOOSER*

Lösung I: Fuchsin (basisch) 0,25%

Der Farbstoff wird in destilliertem Wasser auf dem Wasserbad gelöst. Man läßt die Farblösung über Nacht stehen und filtriert dann.

Lösung II: Citronensäure 0,5%

Lösung III: Methylenblau, wässrig 1%

Der Farbstoff wird auf dem Wasserbad gelöst, über Nacht stehen gelassen und dann filtriert.

Ausführung der Färbung

- Unfixierte Ausstrich-, Quetsch- oder Tupfpräparate werden während 5 Minuten mit Fuchsin (I) gefärbt.
- Differenzieren mit Citronensäure (II), wenige Sekunden.
- Kurz auswaschen unter fließendem Wasser.
- Färben mit Methylenblau (III), 20 Sekunden.
- Überschüssigen Farbstoff kurz auswaschen.
- Trocknen lassen.

Die Haltbarkeit dieser Färbung ist nur von kurzer Dauer (einige Monate), doch kann sie durch Eindecken mit Cedernöl verlängert werden.

Die Rickettsien färben sich rot an, das Plasma blau.

Manson-Färbung (zur Darstellung von Plasmodien)

Stammlösung: reines Methylenblau	2 g
Borax	5 g
dest. Wasser	100 cm ³

Statt Borax können auch 0,2 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3) verwendet werden.

Borax und Methylenblau werden fein pulverisiert. Das destillierte Wasser wird erhitzt (darf aber nicht kochen!) und zuerst Borax, dann Methylenblau zugesetzt, die sich unter Schütteln völlig lösen. Nach Erkalten sollte man die Lösung möglichst einige Tage stehen lassen, hie und da umschütteln und dann filtrieren.

Färbung:

- zu einigen Tropfen Stammlösung gerade soviel dest. Wasser zusetzen, bis die Lösung in durchfallendem Licht durchsichtig wird.
- Präparate nach Fixieren in Methylalkohol (dicke Tropfen müssen vorher haemolysiert werden) 5—20 Minuten färben, nicht länger!
- Abspülen mit dest. Wasser.
- Trocknen lassen.

Romanowsky-Gemische

Diese Gemische werden zur Darstellung von Blutparasiten (wie *Plasmodien*, *Trypanosomen*, *Spirochaeten* etc.) verwendet, da sie gleichzeitig Parasiten und Blutzellen sehr schön differenziert anfärben. Die Farbstoffe sind z. T. nur in Pulver- oder Tablettenform, z. T. auch in fertiger Stammlösung käuflich. Sehr wichtig für das Gelingen der Färbung ist die Verwendung tadelloser Lösungen (ohne Ausfällungen) und einwandfreien destillierten Wassers. Das Resultat ist zudem abhängig vom jeweiligen pH (vgl. S. 237) des zur Verdünnung verwendeten destillierten Wassers.

1. Destilliertes Wasser

Dieses sollte mit Hilfe eines gläsernen Destillationsapparates gewonnen werden, da Metallspuren die Färbung stören. Falls auch nach Destillieren bei der Verwendung Ausfällungen auftreten, empfiehlt es sich, das Wasser zwei- bis dreimal zu destillieren. Falls dies nicht möglich ist, verwendet man am besten Regenwasser, welches direkt in sauberen Gefäßen aufgefangen, also nicht etwa über eine Dachrinne gesammelt wird.

2. Neutralisieren

Das zur Verdünnung der Lösungen verwendete Wasser sollte möglichst neutral sein. Zum Neutralisieren können folgende Lösungen verwendet werden:

1% Natriumbicarbonat
 gesättigtes Lithiumcarbonat.

Das pH wird am besten mit einem der käuflichen Indikatorpapiere, z. B. L y p h a n, kontrolliert. GIEMSA empfiehlt eine frisch zubereitete Lösung von einigen H ä m a t o x y l i n - K r i s t a l l e n in absolutem Alkohol. 10 cm³ des zu prüfenden Wassers werden mit einigen Tropfen dieser Lösung versetzt. Bei einem pH von 7—7,2 tritt innert 1—5 Minuten eine schwache Violett-färbung auf, während bei niedrigerem pH die Lösung farblos bleibt, bei einem höheren die Färbung rascher eintritt.

Falls dies nicht möglich ist, kann das destillierte Wasser, oder im Notfall auch Regenwasser, kurz vor Gebrauch ca. 20 Minuten in einem offenen Glasgefäß abgekocht werden, wodurch das CO_2 entweicht. Nach dem Abkochen muß das Wasser sofort in einer bis zum Rand gefüllten Flasche gut verschlossen werden.

3. Puffern des destillierten Wassers

Noch besser bewährt sich das Puffern des destillierten Wassers mit den SOERENSEN'schen Phosphatpuffergemischen. Diese Methode gestattet es am ehesten, stets unter konstanten Bedingungen zu arbeiten, und das pH kann je nach Art des Parasiten (vgl. S. 237) leicht variiert werden.

Stammlösungen nach SOERENSEN:

- a) M/15 primäres Phosphat: 9,08 g KH_2PO_4 /Liter
 b) M/15 sekundäres Phosphat: 9,44 g Na_2HPO_4 (anhydr.)/Liter
 oder: 11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ /Liter

Zur Herstellung von je 100 cm^3 gepuffertem destilliertem Wasser wird nach folgendem Schema gemischt (nach PETERS, J., und VAN SLYKE, 1932):

$\text{pH}_{20^\circ\text{C}}$	cm^3 M/15 Na_2HPO_4	cm^3 M 15 KH_2PO_4	cm^3 aq. dest.
7,2	7,44	2,56	90
7,0	6,11	3,89	90
6,8	4,96	5,05	90
6,6	3,75	6,25	90
6,4	2,67	7,33	90

Einfacher, aber ziemlich kostspielig ist die Verwendung von Puffer-Tabletten, die heute für jedes beliebige pH hergestellt werden.

Field (wird vor allem in England verwendet)

Rasche Methode zur Färbung dicker Tropfen.

Lösung I: gepuffertes dest. Wasser	
Na_2HPO_4 , wasserfrei	10 g
KH_2PO_4	12,5 g
dest. Wasser	ad 1000 cm^3
Lösung II: Methylenblau	0,4 g
Azur I	0,25 cm^3
gepuffertes dest. Wasser (I)	250 cm^3
Lösung III: Eosin	0,5 g
gepuffertes dest. Wasser (I)	250 cm^3

Die Lösungen II und III können in gut verschlossenen Flaschen mehrere Wochen gehalten werden, die Pufferlösung sollte jedoch öfters erneuert werden.

Färbung:

- Objektträger mit dicken Tropfen werden 1—3 Sekunden in Lösung II eingetaucht.
- Auswaschen in gepuffertem destilliertem Wasser (I) 1—2 Sekunden.
- Eintauchen in Lösung III 2—3 Sekunden.
- Kurz spülen unter fließendem Wasser.
- Objektträger, Schicht nach unten, trocknen lassen.

Giemsa (die am meisten verwendete Methode)

(Gebrauchsfertige Stammlösungen, mit denen wir gute Erfahrungen gemacht haben, werden von GEIGY, Basel/Schweiz, hergestellt.)

a) Ausstriche

Ausstriche oder Tupfpräparate von Organen werden nach Trocknen 3 Minuten mit Methanol (oder 20 Minuten mit Aethanol) fixiert; man läßt trocknen und färbt dann in einer Cuvette oder auf einer Färbeschiene.

Die Färbedauer beträgt je nach Objekt 30—45 Minuten bei einer Verdünnung der käuflichen Stammlösung von 1 : 25 mit gepuffertem (oder zumindest neutralem) destilliertem Wasser.

Ein pH zwischen 6,8 und 7,2 gibt je nach Objekt (s. Kapitel Technik der verschiedenen Erreger) die besten Resultate.

Man spült kurz mit Leitungswasser und läßt an der Luft trocknen. Schicht nach unten.

b) Dicke Tropfen

Gut getrocknete Präparate werden ohne vorheriges Fixieren direkt gefärbt (wie Ausstriche; die verdünnte Farblösung haemolysiert und färbt gleichzeitig) oder vorher kurz mit destilliertem Wasser behandelt, bis alles Haemoglobin herausgelöst ist (vgl. S. 385)¹.

c) Schnittpräparate

Zur Fixierung wird vor allem CARNOY empfohlen.

Originalmethode nach GIEMSA:

- Waschen der entparaffinierten Schnitte in gepuffertem dest. Wasser, 1 mal wechseln.
- Färben in GIEMSA 1 : 50 mit gepuffertem Wasser (S. 399) verdünnt (am besten pH 7,0) ca. 4 Stunden.
- Spülen der überfärbten Schnitte in gepuffertem dest. Wasser.
- Differenzieren und Entwässern:
 - Aceton 95 cm³ + Xylol 5 cm³
 - Aceton 70 cm³ + Xylol 30 cm³
 - Aceton 30 cm³ + Xylol 70 cm³
 - reines Xylol (2 mal).
- Eindecken mit neutralem Balsam, am besten mit grünem Euparal (S. 404).

Methode nach SHORTT und COOPER:

Auch hier wird zur Fixierung vor allem CARNOY empfohlen, ferner Einbettung über Buthanol.

- Auswaschen in Brunnenwasser.
- 1 Stunde oder länger färben in:

GIEMSA	10 cm ³
Aceton	10 cm ³
Methanol	10 cm ³
dest. Wasser	100 cm ³ (pH 7,2—7,4)

¹ Alte Präparate, die sich mit GIEMSA meist stark blau überfärben, können mit NaH₂PO₄ differenziert werden. Die Präparate werden mit einer Lösung von NaH₂PO₄ (1%), der man auf 10 cm³ 2—3 Tropfen einer Eosinlösung (1%) zufügt, behandelt; 1—4 Minuten, bis der Farbton von blau in rötlichbraun umschlägt.

- Auswaschen in Brunnenwasser (kurz).
- Differenzieren in:

Kolophonium	15 g
Aceton	100 cm ³

15 Sekunden oder länger; muß bei schwacher Vergrößerung unter dem Mikroskop kontrolliert werden.

- Waschen in Aceton 70 cm³/Xylol 30 cm³, mehrmals wechseln.
- Waschen in reinem Xylol, mehrmals wechseln.
- Eindecken mit grünem Euparal (S. 404).

Kingsley

ist zeitsparend, da sowohl Ausstrich- wie Schnittpräparate in wenigen Minuten gefärbt werden; eignet sich besonders für Schnittpräparate mit *Plasmodien*, *Trypanosomen* etc.

KINGSLEY I und II können gebrauchsfertig gekauft werden (z. B. bei GURR Ltd., London SW 6). Zum Färben aller Präparate werden die beiden Lösungen 1 : 1 gemischt. Die Mischung ist mehrere Monate haltbar.

KINGSLEY I:	Methylenblau (medizinal)	0,065 g
	Methylen-Azur A	0,01 g
	Glycerin	5,0 cm ³
	Methanol	5,0 cm ³
	dest. Wasser	25,0 cm ³
	Puffer, pH 6,9	15,0 cm ³
KINGSLEY II:	Methylviolett (Bernthsen)	0,013 g
	Eosin, gelb, wasserlöslich	0,045 g
	Glycerin	5,0 cm ³
	Methanol	10,0 cm ³
	Aceton	35,0 cm ³

Als Puffer werden M/15 primäres und sekundäres Phosphat nach SOERENSEN verwendet (s. oben): 9 cm³ Na₂HPO₄ + 6 cm³ KH₂PO₄ ergibt ein pH von 6,9.

a) Ausstriche

Die trockenen Ausstriche werden mit Methanol (evtl. Aethanol) fixiert (1—3 Minuten) und trocknen gelassen.

- Überschichten mit der Farblösung (I und II, Mischungsverhältnis 1 : 1), 5—8 Minuten.
- Kurz spülen mit dest. Wasser.
- Trocknen lassen, Schicht nach unten.

b) Schnittpräparate (Paraffin)

- Auswaschen der entparaffinierten Schnitte mit dest. Wasser.
- Überschichten mit der Farblösung während 9—10 Minuten.
- Mehrmals waschen mit dest. Wasser.
- Differenzieren in dest. Wasser 60 cm³ + 0,75 cm³ Essigsäure 1%.
- Auswaschen in dest. Wasser und kontrollieren unter dem Mikroskop.
- Absaugen des überschüssigen Wassers.
- Waschen in:

Aceton	60 cm ³
Essigsäure 1%	0,5 cm ³
Eosin 5%	0,01 cm ³ (gelöst in Methanol)
- Waschen in:

Buthanol	60 cm ³
Eosin 5%	0,02 cm ³

- Waschen in neutralem Xylol, kontrollieren (evtl. zurück in schwache Essigsäure und noch stärker differenzieren).
- Neutrales Xylol I, II und III.
- Eindecken mit neutralem Balsam, am besten grünem Euparal.

Leishman (findet vor allem in England Verwendung)

Gute Färbung für Blutausstriche, besonders für *Plasmodien*. Die Schüffner-Tüpfelung, Maurer- und Zieman-Flecken werden besonders deutlich dargestellt.

Dicke Tropfen können nach Enthaemoglobinisieren und nochmaligem Trocknen gleich behandelt werden wie Ausstriche.

Der Farbstoff ist in Pulver- oder Tablettenform käuflich, neuerdings auch als Lösung.

10 cm³ reines Methanol werden in eine braune Flasche gegeben, 0,015 g Farbstoff zugesetzt, die Flasche dicht verschlossen und einige Minuten kräftig geschüttelt. Am ersten und zweiten Tag mehrmals schütteln, dann ist die Farblösung gebrauchsfertig. Die Lösung ist kühl aufbewahrt einige Monate haltbar.

- Die Präparate werden auf eine Färbeschiene gelegt.
- Auftropfen der unverdünnten Farblösung, welche die Präparate gleichzeitig fixiert; die Tropfen werden dabei gezählt.
- Nach 30 Sekunden Zufügen der gleichen Tropfenzahl gepufferten dest. Wassers (pH 7—7,2) (S. 399) und durch mehrmaliges Aufsaugen mit der Pipette gut mischen. In dieser Lösung:
 - Färben 15—20 Minuten.
 - Waschen unter fließendem Wasser.
 - An der Luft trocknen lassen, Schicht nach unten.

Wright (wird in Amerika statt Leishman verwendet)

Herstellung der Farblösung wie bei Leishman beschrieben, nur nimmt man hier 0,05 g Farbstoff auf 10 cm³ Methanol. Die Färbung wird wie bei LEISHMAN ausgeführt.

Silberimprägnationen

Stückimprägnierung nach Levaditi (für Spirochaeten)

3 mm³ große Gewebestückchen werden in neutralem Formol 10% oder nach REGAUD fixiert, anschließend bis 24 Stunden in Alkohol 96% eingelegt.

- Wässern in dest. Wasser, bis die Stückchen nicht mehr schwimmen, Wasser mehrmals wechseln.
- Silberimprägnation mit Silbernitrat (AgNO₃) 2% im Thermostat bei 37° C, 3—6 Tage.
- Waschen in dest. Wasser, 1—2 Stunden.
- Behandeln (24—48 Stunden) mit einer Lösung von:

Pyrogallol	5 g
dest. Wasser	100 cm ³
Formol 40%	2—5 cm ³

- Spülen in dest. Wasser.
- Einbetten in Paraffin.

Versilberung nach Rio Hortega

modifiziert von NIETO-GAICEDO

Zur Darstellung von Cystendärmen von *Anophelen* oder *Aedes*, vgl. auch die auf S. 396 beschriebene einfachere Methode nach DELAFIELD.

Fixieren der frischsezierten Mückendärme in neutralem Formol 4%. Nach längerer Fixierdauer müssen die Objekte in destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen werden, da Formolspuren die Imprägnation verderben. Ferner gelingt diese Methode nur in peinlich sauberen Glasgefäßen!

- Därme in ca. 50 cm³ dest. Wasser während ca. 5 Minuten wässern.
- Überführen in eine Lösung von 4—5 Tropfen Ammoniak in 50 cm³ dest. Wasser 20—30 Minuten.
- Überführen in dest. Wasser plus 2 Tropfen Ammoniak. Damit sind die Objekte vom Formol gereinigt und bereit zur Imprägnation.
- Imprägnieren in einer Lösung von Silbercarbonat (Herstellung s. unten) während 2—2½ Minuten. Es darf keine Färbung auftreten. Braunfärbung ist ein Zeichen für ungenügende Entfernung des Formols.
- Auswaschen in dest. Wasser, 5 Minuten.
- Überführen in frisches dest. Wasser, 1—2 Minuten.
- Überführen in Formollösung 1% (säurefreies Formol!), in welcher die Därme eine dunkel tabakbraune Farbe annehmen sollen. In diese Flüssigkeit müssen die Objekte einzeln überführt werden. (Einzelkontrolle unter der Binocularlupe!)
- Überführen in Goldchloridlösung 1%, ca. 5 Minuten. Die Braunfärbung schlägt in Dunkelviolett um.
- Überführen in eine Lösung von Natriumthiosulfat 5% zur Fixierung, 1 Min.
- Auswaschen in dest. Wasser, 1 Minute.
- Aufsteigende Alkoholreihe: 50, 60, 70, 80, 90% Alkohol je 1 Minute, Alkohol 100% 4—5 Minuten.
- Aus Alkohol 100% überführen in Karbolxylol.
- Einschließen in Kanadabalsam.

Herstellung der Silbercarbonatlösung

a) AgNO ₃ -Lösung	10%	50 cm ³
b) NaCO ₃ -Lösung	5%	150 cm ³

Lösung b) unter ständigem Schütteln zu Lösung a) tropfenweise zusetzen. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der sich in NH₄OH auflöst. Auflösen des Niederschlages durch tropfenweises Zugießen von NH₄OH (25—40%) unter ständigem Schütteln. Zum Gebrauch wird die Lösung auf 450 cm³ mit dest. Wasser verdünnt.

Thedanblau-Färbung nach Simons

Schnellfärbung für *Trypanosomen* und *Spirochaeten*, besonders für Massenuntersuchungen und rasche Diagnosen geeignet. Findet auch zum Immobilisieren von Spirochaeten Verwendung (vgl. S. 337).

Durch eine Kombination von Saponin mit dem Farbstoff werden die Erythrocyten sofort haemolysiert, was die Untersuchung einer relativ dicken Blutschicht ermöglicht.

Thedanblau ist ein stabilisiertes Methylenblau-Saponin-Gemisch, das auch in den Tropen unbeschränkt haltbar ist.

1—2 Ösen T 3 (gebrauchsfertige Thedanblau-Lösung, hergestellt durch Né-

GOCIATEUR AG., Münchenstein-Basel, Schweiz) auf einen Objektträger möglichst flach und nahe beisammen aufsetzen. 1 Öse Blut mit der noch feuchten T 3-Lösung vermischen und etwa 2 Sekunden gut verrühren; Deckglas auflegen und sofort untersuchen. So hergestellte Präparate sind nur einige Stunden haltbar.

Tusche-Färbung nach Burri

Zur Darstellung von *Spirochaeten* geeignet, falls kein Dunkelfeld zur Verfügung steht.

1 Tropfen frisches Blut wird mit einem gleichgroßen Tropfen chinesischer Tusche auf einem entfetteten Objektträger gemischt und ein dünner Ausstrich hergestellt. Die Spirochaeten leuchten hell auf gegen einen schwarzen Hintergrund (Dunkelfeld-Effekt!).

Einschluß- und Umrandungsmittel

<i>Faure</i>	Glycerin	2 Teile
	Gummi arabicum	3 Teile
	Chloralhydrat	5 Teile
	dest. Wasser	5 Teile

Die Objekte werden aus dest. Wasser in die FAURE'sche Lösung übertragen. Alkoholfixiertes Material muß zuerst gewässert werden.

Glycerin-Gelatine (für Würmer und Wurmeier)

feinste Gelatine	7 g
dest. Wasser	42 cm ³

Das Gelatine-Wasser wird 2 Stunden gekocht, dann fügt man

Glycerin	50 cm ³
Karbonsäure, krist.	0,5 g zu.

Das Gemisch wird vor Gebrauch jeweils 10—15 Minuten auf dem Wasserbad bis zur Verflüssigung erwärmt. Der Zusatz von Karbonsäure verhindert die Bildung von Schimmelpilzen.

Grünes Euparal

(hergestellt durch FLATTERS & GARNETT Ltd., Manchester)

Grünes Euparal ist ein neutraler Balsam, besonders geeignet für nach GIEMSA gefärbte Ausstriche und Schnitte.

Kanadabalsam

Kanadabalsam ist ein viel verwendetes Einschlußmittel für histologische Präparate sowie für Totalpräparate (statt PURI). Er ist hingegen wenig geeignet für GIEMSA-Präparate, da die immer vorhandenen Säurespuren die Färbung rasch angreifen.

Noyer-Paste (zum Umranden)

wasserfreies Lanolin	20 Teile
Kolophonium	80 Teile

Das Lanolin wird während etwa 15—30 Minuten in einem Porzellantiegel mäßig erhitzt. Dann wird das Kolophonium stückweise unter ständigem Rühren zugesetzt (Achtung, feuergefährlich!). Die fertige Paste soll homogen und klar gelbbraun sein. Man füllt die Masse am besten in kleine Blechschachteln ab. Das Auftragen erfolgt mit einem heißen Metallspatel.

Plastik

Ganze Insekten werden neuerdings häufig direkt in Plastik eingeschlossen, z. B.

Ward's Bio-Plastic:

WARD'S NATURAL SCIENCE ESTABLISHMENT, Inc. 3000 Ridge Rd.
E. Rochester 9, N.Y.

Turtox Embedding Plastic:

TURTOX GENERAL BIOLOGICAL SUPPLY HOUSE, Inc. 761-763 East 69th Place
Chicago, Illinois.

Genaue Vorschriften können durch die betreffenden Firmen bezogen werden. Wer sich Übung in der Anwendung dieser Methoden erwirbt, kann prachtvolle Dauerpräparate für Schausammlungen und für Lehrzwecke herstellen.

Puri (für Insekten, Insektenlarven geeignet)

Gummi arabicum	8 g
Chloralhydrat	70 g
Eisessig	3 cm ³
Glycerin	5 cm ³
dest. Wasser	10 cm ³

Die Mischung wird im Wasserbad gelöst, dann durch Gaze filtriert. Die Präparate werden aus dest. Wasser in die PURI'sche Lösung übertragen.

Renohistol

Neutraler Balsam zum Einschließen von histologischen Präparaten.

Umranden von Präparaten

Präparate, welche in wasserhaltige Gemische eingeschlossen werden (z. B. FAURE, Glycerin-Gelatine etc.), müssen, sobald die Einschlußmasse fest geworden ist, umrandet werden, da sonst immer weiter Wasser verdunstet und Luft nachgezogen wird.

Hierzu eignen sich vor allem NOYER-Paste (s. oben) oder Zapon-Lack (Nagellack). Letzterer wird mit Hilfe eines feinen Pinsels aufgetragen. Die Präparate müssen vor dem Umranden sorgfältig gereinigt und überschüssige Einschlußmasse entfernt werden.

Herstellung von Nährmedien

1. Sterilisieren von Glaswaren, Instrumenten, Lösungen

- a) Glaswaren:* Pipetten, Kolben etc. werden am besten trocken sterilisiert, indem man sie während 1—2 Stunden einer Temperatur von 180° C aussetzt.
- b) Spritzen und Instrumente* können während 20 Minuten in dest. Wasser gekocht werden.
- c) Lösungen und Instrumente:* Diese werden während 20 Minuten bei einem Druck von 1,5 Atm. im Autoklav sterilisiert.

2. Medien zur Zucht von Bakterien

Wir geben hier nur zwei ganz einfache Rezepte für je einen flüssigen und einen festen Nährboden und möchten im übrigen auf das «Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Procedures» (1953) verweisen.

a) Nährbouillon

Material: Fleischextrakt (Bacto-Beef)	}	oder Nutrient-Broth Difco
Pepton (Difco)		
Dest. Wasser.		

3 g Bacto-Beef läßt man in 1000 cm³ dest. Wasser auf dem Wasserbad bei 50° C 1 Stunde ziehen, kocht kurz auf und filtriert. Dann werden 5 g Pepton zugesetzt, nochmals aufgeköcht, mit Natriumbicarbonat auf pH 6,8—7,0 eingestellt und nochmals filtriert. Das Medium wird in Reagenzgläser abgefüllt und diese während 15—20 Minuten im Autoklav bei 1,5 Atm. sterilisiert.

Bei Verwendung von Bacto-Nutrient-Broth löst man 8 g der pulverisierten Mischung in 1000 cm³ destilliertem Wasser, füllt in Reagenzgläser ab und sterilisiert wie oben.

b) Nähragar

Material: Bacto-Agar (Difco)	}	oder Bacto-Nutrient-Agar
Bacto-Beef (Difco)		
Pepton (Difco)		

3 g Fleischextrakt und 5 g Pepton werden wie unter a) beschrieben verarbeitet, dann 15 g Bacto-Agar zugesetzt. Wird Agar noble verwendet, so erhitzt man die Lösung, bis aller Agar gut gelöst ist. Nimmt man gewöhnlichen Agar, so muß nochmals filtriert werden, und zwar durch Watte. Dann wird der Agar heiß in Reagenzgläser oder Petri-Schalen abgefüllt und im Autoklav während 15—20 Minuten bei 1,5 Atm. sterilisiert.

Bacto-Nutrient-Agar entspricht in der Zusammensetzung obigem Rezept. 23 g des dehydrierten Mediums werden mit 1000 cm³ kaltem destilliertem Wasser versetzt und bis zum Kochen erhitzt. Dann abfüllen und sterilisieren wie oben. Die Reaktion dieses Mediums liegt bei pH 6,8.

3. Medien für Darmprotozoen (spez. *E. histolytica*)

a) *Milieu normal* (Institut Pasteur, Paris)

Material: steriles Pferdeserum (am besten filtrieren durch Seitz- oder Berkefeld-Filter, dann monatelang haltbar).

NaCl.

KCl.

CaCl₂.

NaHCO₃.

Reisstärke, pulverisiert (Difco).

Natriumbicarbonatlösung 1%.

Essigsäure 1%.

Lyphanpapier (zur Prüfung des pH).

KH₂PO₄ (nach SOERENSEN).

Na₂HPO₄ (nach SOERENSEN).

Salze am besten pro analysi.

Herstellung des festen Teils

1½—2 cm³ steriles Pferdeserum pro Glas wird in sterile Reagenzgläser abgefüllt. Dann läßt man das Serum bei schräggestellten Reagenzgläsern koagulieren (3—5 Minuten in Wasserdampf oder 1 Stunde bei 80° C).

Herstellung des flüssigen Teils

Sterilisieren der Reisstärke: In kleine Glastuben wird je ca. 1 cm³ feinpulverisierte Reisstärke abgefüllt. Die mit Watte gut verschlossenen Tuben werden an drei aufeinanderfolgenden Tagen während je einer Stunde bei 110° C trocken sterilisiert.

Sterilisieren des Natriumbicarbonates: Je 0,02 g NaHCO₃ wird in schmale Glastuben abgefüllt, mit Aether überschichtet und mit Watte leicht verschlossen. Sobald aller Aether verdunstet ist, kann das Bicarbonat benützt werden.

Ringer-Stammlösung:

NaCl	60 g
KCl	1 g
CaCl ₂	1 g
dest. Wasser	ad 1000 cm ³

Pufferlösung:

Na-Phosphat	5 g
K-Phosphat	1 g
dest. Wasser	ad 100 cm ³

Die Ringer-Stammlösung wird zum Gebrauch 1 : 10 mit dest. Wasser verdünnt, auf pH 7 eingestellt und dann ebenso wie die Pufferlösung 20 Minuten im Autoklav bei 1,5 Atm. sterilisiert. Das Natriumbicarbonat wird erst nachher zugesetzt, da sich sonst beim Sterilisieren das wasserunlösliche CaCO₃ bildet.

Auf je 100 cm³ Ringer-Lösung setzt man nach Sterilisieren zu:

sterile Reisstärke	ca. 1 cm ³
steriles Natriumbicarbonat	0,02 g
steriles Pferdeserum	14—20 cm ³
sterile Pufferlösung	2 cm ³

Alles wird durch Schütteln gut vermischt und dann jeweils soviel Flüssigkeit in die einzelnen Reagenzgläser eingefüllt, daß der feste Teil gerade bedeckt wird. Die Mischung muß vor dem Aufsaugen mit der Pipette stets gut geschüttelt werden, damit die Stärke gleichmäßig verteilt werden kann.

Die fertigen Nährböden werden für 48 Stunden in einen Thermostat von 37° C gebracht und dann einzeln auf Bakterienwachstum geprüft. Die Nähr-

böden sind im Eisschrank mehrere Wochen haltbar. Das Inokulieren erfolgt mit Hilfe einer Pasteur-Pipette. *E. histolytica* wächst am Boden der Kultur unter Bildung von schleimigen Kolonien. *E. invadens* (eine Schlangenamöbe) dagegen findet sich in der am Boden abgesetzten Stärke verteilt. Bei eigentlichen Amöben-Zuchten genügt es meist, einen Tropfen des alten Substrats auf eine neue Kultur zu überimpfen, bei größeren Mengen überaltern die Kulturen rasch.

Das Impfintervall beträgt für *E. histolytica* ca. 2—3, für *E. invadens* 6—7 Tage.

b) Eidotter-Infusions-Medium nach Balamuth

Material: Hühnereier (12 Eier reichen für 100 Reagenzgläser; statt frischer Eier kann auch Trockeneipulver verwendet werden: 9 g Eipulver entspricht 1 Ei)

NaCl.

K₂HPO₄.

KH₂PO₄.

- Eier 15 Min. kochen (es ist wichtig, daß frische Eier von guter Qualität verwendet werden).
 - Eier schälen und das Eiweiß vom Eidotter abtrennen. Dotter mit Pistill durch feines Sieb in ein Becherglas passieren. (Evtl. pulverisieren mit elektrischem Mixer.)
 - Pro 4 Eidotter 125 cm³ physiol. Kochsalzlösung 0,8% zugeben, gut vermischen, in einem Erlenmeyer-Kolben übergießen und mit gutschließenden Gummipropfen verschließen.
 - In Wasserbad 20 Min. erhitzen, gerechnet vom Moment des Siedens an.
 - Durch einen Buchner-Trichter, der mit Filterpapier ausgelegt ist, sorgfältig filtrieren, oder durch eine mit Filterpapier (Sargent 500) ausgelegte Nutsche mit Wasserstrahlpumpe passieren. Die Flüssigkeit muß dabei sorgfältig durch ein zusammengeknülltes Gazestück, das in den Trichter eingelegt wird, dekantiert werden, um das Filterpapier frei von Sediment zu halten.
 - Filtrat in sauberen Erlenmeyer-Kolben übergießen und im Autoklav 15 Min. bei 1,5 Atm. sterilisieren.
 - In Eiswasser rasch abkühlen und ein zweites Mal filtrieren. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Suspension nach dem Sterilisieren nicht geschüttelt wird.
 - Filtrat abmessen und bis auf das ursprüngliche Volumen (125 cm³ pro 4 Eidotter) mit Kochsalzlösung 0,8% auffüllen.
 - Dieselbe Menge einer M/15 Pufferlösung mit pH 7,5 zugießen.
- Zubereiten der M/15 Pufferlösung:

M/1 K₂HPO₄ (= 17,42%) 4,3 Teile

M/1 KH₂PO₄ (= 13,61%) 0,7 Teile

Jede dieser beiden Lösungen, sowie ihre Mischung, kann als separate Stammlösung aufbewahrt werden.

Um M/15 Pufferlösung herzustellen, mischt man unmittelbar vor Gebrauch:

M/1 Pufferlösung	1 Teil
Dest. Wasser	14 Teile

- In Kulturgläschen (Größe 16 × 150 mm Reagenzglas) je 7,5 cm³ dieser Kulturmedien verteilen.
- Kulturgläschen im Autoklav 15 Min. bei 1,5 Atm. sterilisieren.

- Diese Kulturgläser können nun im Eisschrank mehrere Wochen aufbewahrt werden. Die Behälter mit den Kulturmedien sollten dabei mit Wachspapier abgeschlossen werden, um die Verdunstung des Mediums zu verhindern.
- Einige Stunden vor Gebrauch in Wärmeschrank mit 37° C stellen.
- Unmittelbar vor Inokulation der Nährböden ca. 10 g von steriler Difco Reisstärke zusetzen. Die Reisstärke muß vorher in einem Thermostat 1½ Stunden bei 150° C sterilisiert werden. Höhere Temperaturen verbrennen die Stärke. Noch besser ist Sterilisation bei 120° C eine Stunde an alternativen Tagen.
- Überimpfen von 1—2 Tropfen Kultursediment auf frische Nährböden alle 48—72 Stunden.

Dieses Medium genügt zur Haltung von Amöben-Stämmen, jedoch ergeben sich nicht besonders reiche Kulturen. Um — für diagnostische Zwecke — ein besonders rasches Wachstum zu erzielen, empfiehlt BALAMUTH Zusatz einer sterilen Lösung (5%) von WILSON's pulverisiertem Leberkonzentrat im Verhältnis 1 : 10.

Die Vermehrung der Amöben kann auch durch Zusatz von menschlichem Serum gefördert werden.

c) *Alkohol-Eidotter-Extrakt nach Nelson*

- Zerriebener, hartgesottener Eidotter, 1 Teil auf 9 Teile Alkohol 95%, wird während 48 Stunden extrahiert, öfters umschütteln. Überstehende Flüssigkeit anfangs trübe, wird aber nach einigen Tagen ganz klar. Nur das *klare* Supernatans wird für die Nährböden verwendet. (Diese Stammlösung ist mehrere Wochen haltbar.)
- Zur Bereitung der Nährböden von der benötigten Menge der Stammlösung den Alkohol im Wasserbad abdampfen, bis eine dickflüssige Paste zurückbleibt.
- Zum Rückstand das doppelte Volumen Agars 2% gelöst in gepufferter (pH = 7,4—7,0) Kochsalzlösung 0,5% zusetzen.
- Diese Masse in die Kulturgläschen verteilen, sterilisieren und in Schräglage erkalten lassen.
- Abgekühltes, festes Eidotter-Agarmedium mit gepufferter Kochsalzlösung 0,5% bedecken.
- Sterile Reisstärke zusetzen, unmittelbar vor Inokulation.

Dieses Medium ist seiner Einfachheit wegen zur Kultivierung von *E. histolytica*, wie auch von Darmflagellaten zu empfehlen.

4. Medien zur Zucht von Haemoflagellaten

a) *Medium nach Davis, modifiziert nach Pifano*

Material: Agar (Agar Noble, Difco).
 Pepton (Neopepton, Difco).
 Bacto-Beef (Difco).
 NaCl (pro analysi).
 Glukose.
 Defibriniertes Blut (am besten menschliches Blut,
 sonst Kaninchenblut).
 NaHCO₃ 1%
 Essigsäure 1%.
 Lyphanpapier.

Glukosehaltiger Nähragar nach DAVIS

Agar in Stücken	20 g
(pulverisiert)	17,5)
Pepton	10 g
Fleischextrakt	5 g
NaCl	6 g
Glukose	20 g
dest. Wasser	ad 1000 cm ³

Man läßt Bacto-Beef und destilliertes Wasser eine Stunde bei 50° C im Wasserbad ziehen, kocht kurz auf und filtriert. Dann werden die restlichen Bestandteile zugesetzt (Agar Noble kann später zugesetzt werden, da dieser nicht mehr filtriert werden muß), die Lösung mit Essigsäure 1% oder Bicarbonat auf pH 7—7,2 neutralisiert und nochmals kurz aufgeköcht und filtriert. Falls der Agar mitfiltriert wird, muß statt Filterpapier *W a t t e* benützt werden.

Pro Reagenzglas werden je 3 cm³ Nähragar abgefüllt und bei 1,5 Atm. 20 Minuten im Autoklav sterilisiert. Steriler Nähragar kann im Eisschrank mehrere Wochen aufbewahrt werden; er sollte aber nie mehr als einmal sterilisiert werden, da sonst die Glukose karamellisiert.

Sobald der Agar auf 40—50° C abgekühlt ist, wird pro Reagenzglas 1 cm³ steriles, defibriniertes Blut zugesetzt. Bei höherer Temperatur gerinnt das Blut, bei tieferer läßt es sich nicht mehr gut mit dem Agar mischen.

Sofort nach Zugabe des Blutes werden die einzelnen Nährböden rasch zwischen den Handflächen gequirt, bis der Inhalt homogen gemischt ist, und dann in schräger Lage rasch abgekühlt, am besten durch Auflegen von Eisstücken.

Die Nährböden werden nun für 24 Stunden in einen Thermostaten von 37° C gegeben zur Zerstörung der Komplemente und zur Prüfung der Sterilität.

Glukosehaltige Nährbouillon nach PIFANO

Bacto-Beef	3 g
Pepton	20 g
Glukose	20 g
NaCl	6 g
dest. Wasser	ad 1000 cm ³

Die Lösung wird, wie unter Nähragar beschrieben, hergestellt, das pH ebenfalls auf 7—7,2 eingestellt und dann im Autoklav sterilisiert. Jedem Nährboden wird ca. 1 cm³ Nährbouillon zugesetzt.

Die fertigen Nährböden sind im Eisschrank mehrere Wochen haltbar. Man inokuliert neue Nährböden mit einer Platinöse und hält die inokulierten Nährböden bei einer Temperatur von 24° C.

Das Impfintervall beträgt für *Leishmanien* etwa 10, für *T. cruzi* 14 Tage.

Die Verwendung von Menschen- an Stelle von Kaninchenblut hat sich bei uns als sehr günstig erwiesen, da sich dann auf diesem Medium z. B. bei *T. rangeli* auch metacyclische Formen bilden, die man sonst nur auf RAZGHA-Medien erhält.

b) NNN-Medium nach Novy, MacNeal und Nicolle

(spez. f. *Leishmanien*)

Eine Mischung von:	Bacto Agar (Difco)	14 g
	NaCl	6 g
	dest. Wasser	900 cm ³

wird zu je 6 cm³ in Reagenzgläser abgefüllt und im Autoklav während 20 Minuten bei 1,5 Atm. sterilisiert. Der sterilisierte Agar kann im Eisschrank während mehreren Monaten aufbewahrt werden.

Vor Gebrauch wird dieses Medium im Wasserbad bis zur vollständigen Verflüssigung erhitzt und dann wieder auf 45—48° C abgekühlt. Erst wenn diese Temperatur erreicht ist (bei höheren Temperaturen gerinnt das Blut), setzt man pro Reagenzglas 1—2 cm³ steriles, defibriniertes Kaninchenblut zu und mischt es mit dem Agar zu einer möglichst homogenen Masse, indem man das Reagenzglas zwischen den Handflächen rotiert. Danach werden die Reagenzgläser schräg gelegt und durch Auflegen von Eis möglichst rasch abgekühlt, damit sich genügend Kondenswasser bildet.

Die fertigen Nährböden werden während 24 Stunden im Thermostat auf Sterilität geprüft (bei 37° C). Um den Verlust des Kondenswassers zu verhüten, muß der Watte-Verschluß mit einer Gummikappe überzogen werden. Das pH dieses Mediums beträgt bei Verwendung von neutralem destilliertem Wasser ca. 7,6 und muß nicht speziell eingestellt werden.

Leishmanien entwickeln sich bei einer Temperatur von 24° C im Kondenswasser und können meist nach 3—4 Tagen, manchmal aber auch erst nach 4 Wochen festgestellt werden.

c) *Razgha-Medium, modifiziert nach Reichenow*

Material: NaCl (Salze am besten alle pro analysi).

KCl.

CaCl₂.

NaHCO₃.

Glukose.

Natriumcitrat, 3,8%.

Aether.

Menschliches Blut (frisch).

LOCKE-Lösung, modifiziert für Trypanosomen

NaCl	3 g
KCl	0,2 g
CaCl ₂	0,12 g
Glukose	2 g
dest. Wasser	ad 500 cm ³

Die LOCKE-Lösung wird im Autoklav bei 1,5 Atm. sterilisiert (20 Minuten) und nach Abkühlen das durch Überschichten mit Aether sterilisierte Natriumbicarbonat (0,1 g) zugesetzt.

Je 3 cm³ sterile LOCKE-Lösung werden in sterile Zentrifugengläschen abgefüllt und die gleiche Menge Citratblut (Mischung 1 : 1) zugesetzt. Die Nährböden müssen vor Gebrauch mindestens 24 Stunden im Eisschrank gehalten werden, bis die Komplemente zerstört sind. Es bildet sich eine Bodenschicht, welche die sedimentierten Blutkörperchen enthält, und darüber eine klare Flüssigkeitsschicht. Die Parasiten werden mit einer Pasteur-Pipette in die Grenzzone übertragen. Man hält die Kulturen bei ca. 24° C.

Das Impfintervall für dieses Medium beträgt 2—4 Monate.

5. Entfernung störender Bakterien aus Kulturen

a) *Darmprotozoen*

Während einer oder mehrerer Passagen können die Kulturen mit Acriflavin behandelt werden. Die für die Zucht notwendigen Bakterien werden von einer Endkonzentration von 1 : 10 000 bis 1 : 12 000 in der Flüssigkeit der

Nährböden noch nicht angegriffen, gewisse störende Bakterien aber bereits vernichtet.

Man stellt eine Stammlösung von 0,2% Acriflavin in physiologischer Kochsalzlösung her, die unbeschränkt haltbar ist und vor Gebrauch im Autoklav sterilisiert werden kann.

b) *Haemoflagellaten*

Kulturen von Haemoflagellaten, die durch Bakterien verunreinigt wurden, können durch einmalige P e n i c i l l i n - Behandlung gereinigt werden. Wasserlösliches Penicillin (z. B. Penicillin G, Crystalline-Potassium von ELY LILLY Inc., Indianapolis, USA.) wird mit Bouillon verdünnt, so daß 1 cm³ noch 5 Einheiten Penicillin enthält.

Diese Konzentration genügt meist schon zur Beseitigung störender Bakterien, ohne das Wachstum der Flagellaten zu beeinflussen (*Leishmanien* z. B. vertragen bis 1250 E/cm³).

In manchen Instituten wird regelmäßig zu jedem Nährboden Penicillin zugesetzt, doch ist dies nach unserer Erfahrung nicht notwendig. Es genügt, dann eine Penicillinkur durchzuführen, wenn bei der Kontrolle Bakterien gefunden werden.