

## 0.0.1 Färbung nach *Pappenheim*

### Vorwort

Die *Pappenheim*-Färbung (*May-Grünwald-Giemsa*) ist eine Weiterentwicklung der *Romanowsky*-Färbung und der *Giemsa*-Färbung. Sie ist die hämatologische Standardfärbung in Europa und fast auch weltweit. Sie wird in der Organzytologie zunehmend als Ersatz für die *Papanicolaou*-Färbung verwandt.

Der russische Mikrobiologe *Dmitry Leonidovich Romanowsky* hat die nach ihm benannte Färbung im Juni 1891 als Dissertation publiziert, sie wurde zur Darstellung von Parasiten entwickelt.<sup>1</sup>

Die *Romanowsky*-Färbung wurde ebenfalls mit dem Augenmerk auf Parasiten von *Gustav Giemsa* weiterentwickelt und 1899 (*Berhard Nocht*) bzw. 1904 (*G. Giemsa*) publiziert.<sup>2</sup> *Giemsa* war Mitarbeiter am Topeninstitut in Hamburg (Leiter: *B. Nocht*) und beschäftigte sich dort vorrangig mit der Malaria.<sup>3</sup>

Die Daten von *Richard May* und *Ludwig Grünwald* benutzte *Arthur Pappenheim*, um die *Giemsa*-Färbung derart zu modifizieren,<sup>4</sup> dass die Granula der hämatopoetischen Zellen deutlicher dargestellt werden, publiziert 1901.<sup>5, 6</sup>

Die *Pappenheim*-Färbung wird in sehr unterschiedlichen Modifikationen mit unterschiedlichen Ergebnissen verwendet, ein allgemein akzeptierter Standard existiert nicht. Die Varianten eignen sich allgemein gut für hämatologische Präparate, aber nicht alle eignen sich für Präparate außerhalb der Hämatologie. Eine Standardisierung der Färbung ist deshalb wünschenswert. Dabei sollte eine Methode festgelegt werden, die a.) in allen kleinen und in spezialisierten Labors durchführbar ist und die b.) nicht nur typische hämatologische Präparate wie Blut, Liquor und Knochenmark gut und zuverlässig anfärbt, sondern auch dickere Präparate, wie sie in der Organzytologie vorkommen.<sup>7</sup>

---

<sup>1</sup>deutsch publiziert in der St. Petersburger Medicinische Wochenschrift, № 34, 1891;

[www.romanowsky.ru/English](http://www.romanowsky.ru/English) und [http://en.wikipedia.org/wiki/Romanowsky\\_stain](http://en.wikipedia.org/wiki/Romanowsky_stain)

<sup>2</sup>Stabilisierung der Färbelösung durch Glycerol

<sup>3</sup>Giemsa G: 1904 Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. Centralblatt für Bakteriologie I Abteilung 32, 307–313; und Giemas, G.: Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. Originale. Bd. XXXVII. Heft 2. S. 308ff;

Nocht B: (1899) Zur Färbung der Malariaparasiten. Centralblatt für Bakteriologie I Abteilung 25, 764–769

[http://en.wikipedia.org/wiki/Giemsa\\_stain](http://en.wikipedia.org/wiki/Giemsa_stain)

<sup>4</sup>„alkoholische“ *May-Grünwald*-Färbung vor der „wässrigen“ *Giemsa*-Färbung

<sup>5</sup>Pappenheim A: 1870-1916. Grundriss der Farbchemie, zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. Berlin, Hirschwald, 1901

<sup>6</sup>Pappenheim A: Folia Haematologica 1912, XIII Archiv (Heft3): 339-345;

[http://de.wikipedia.org/wiki/Artur\\_Pappenheim](http://de.wikipedia.org/wiki/Artur_Pappenheim)

<sup>7</sup>beispielsweise bei Lymphknoten-Aspiraten

In vielen neueren Lehrbüchern wird entweder keine Färbearbeitung beschrieben, in vielen alten Büchern entweder eine unzureichend genaue Anleitung oder sehr unterschiedliche Rezepte. Darunter sind auch Anleitungen, die unbefriedigende Färbungen verursachen und solche, die nur für Blutausstriche taugen, nicht aber für die restliche Zytologie. Solche unzureichenden Rezepte sind auch in den Beipackzetteln verschiedener Hersteller von Färbelösungen abgedruckt. Der häufigste publizierte Fehler ist das Auslassen der unerlässlichen intensiven Fixierung der Präparate in absolutem Methanol.

Im Zeitalter globaler Kommunikation und der zunehmenden Standardisierung und Qualitätsüberwachung (Ringversuche) muss ein zuverlässiges und allgemein akzeptiertes Färbeprotokoll detailliert beschrieben werden. Differenzen zwischen verschiedenen Experten beispielsweise in der ermittelten Blastenzahl sind teilweise Folge unterschiedlicher Färbungen bzw. unterschiedlicher „vertrauter“ Varianten der *Pappenheim*-Färbung. Gerade für die Darstellung des Blastenchromatins ist eine intensive Fixierung der Präparate vonnöten. Dies kann am besten erkannt werden, wenn man Präparate der Mikrobiologen ansieht, die ja ohne *May-Grünwald* arbeiten und ohne Fixierung direkt mit der wässrigen *Giemsa*-Lösung arbeiten; dort sind das Chromatin verklumpt und die Nukleolen übermäßig prominent. Wenn mithilfe der folgenden Anleitung gefärbt wird, ist eine weitgehende Parallelität mit der histologischen HE-Färbung und der histologischen *Giemsa*-Färbung gegeben und damit eine fruchtbare Diskussion der Präparate mit den Hämatopathologen möglich.

#### **Definition und Funktion**

*Pappenheim* = (MGG): **M**ay-**G**rünwald + **G**iemsa; auf Zytoplasmadarstellung spezialisierte Färbung mit guter Chromatindarstellung (ohne Verklumpung); Nukleolen aber weniger prominent dargestellt als z. B. in der HE-Färbung(!). Prinzip: Fixation (Luft, Methanol) → „alkoholische“ Färbung (MG) → „wässrige“ Färbung (G) → Entfärbung („Differenzierung“). Physikochemische Farbstoffbindung, nicht nur Adsorption. Die Färbung kann maximal anfärben ohne Gefahr der Überfärbung, es muss aber am Ende der Färbung eine Differenzierung folgen.

#### **Probenvorbereitung**

Die *Pappenheim*-Färbung liefert die gewohnte Anfärbung an luftgetrockneten Ausstrichen beliebiger Flüssigkeiten und Gewebe. Sie ist 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). Die histologische *Giemsa*-Färbung ergibt ein sehr ähnliches Ergebnis, die detaillierte Zytoplasmadarstellung der *Pappenheim*-Färbung wird aber nicht erreicht.

Der Farbstandard wird erreicht, wenn entweder keine Antikoagulation des Ausgangsmaterials stattfindet<sup>8</sup> oder bei Antikoagulation durch EDTA. Andere übliche Antikoagulanzen (Citrat, Heparin) verfälschen die Färbung teilweise schwerwiegend. In den Lehrbüchern findet man Argumente gegen die Verwendung von EDTA, beispielsweise sollen die Makrophagen dadurch Zytoplasmavakuolen entwickeln. Eine solche Veränderung ist aber diagnostisch nicht bedeutsam. Überdies ist die Zytologie des peripheren Blutes im EDTA-Blut weltweiter Standard. Deshalb sollte eine eventuell erforderliche Antikoagulation mit EDTA als Standard akzeptiert werden.

Die Proben können nach intensiver Lufttrocknung sofort gefärbt werden, nach 24-48 Stunden ist noch keine wesentliche Änderung des Färbeverhaltens festzustellen. Für eine spätere Färbung (beispielsweise nach dem Wochenende) sollten die Präparate sofort nach der Trocknung fixiert werden.<sup>9</sup>

### eigene Modifikation

In den Jahren 1985 bis 1995 wurde die *Pappenheim*-Färbung in der Hämatologie der Universität Ulm derart modifiziert, dass sowohl dünne Präparate als auch dicke Präparate (Knochenmarkzytologie, Organzytologie) identisch und immer gleich angefärbt werden. Dicke Präparate werden erst dann überall gleich angefärbt, wenn nach Lufttrocknung eine ausreichend lange Fixierung mit absolutem *Methanol* erfolgt. Die weit verbreitete Methode, die getrockneten Präparate direkt in die *May-Grünwald*-Färbelösung zu geben, verursacht kaum angefärbte dicke Anteile der Präparate. Dies fällt bei Knochenmark-Bröckeln weniger auf, da ihre Binnenstruktur von geringem diagnostischem Wert ist. Aber in anderen Geweben (Organzytologie) hat die Gewebestruktur einen hohen diagnostischen Stellenwert.

Überdies haben wir die Färbelösungen konzentrierter angesetzt und sind unsere Färbezeiten länger, als vielfach zuvor in Lehrbüchern angegeben wurde. Dies wiederum hat zur Folge, dass die Präparate gründlicher entfärbt werden müssen, damit die Farbstoffe, die sich im Gewebe anlagern, ohne physikochemisch gebunden zu sein, wieder entfernt werden („Differenzierung“ der Färbung). Die *Pappenheim*-Färbung lässt eine solche Prozedur ohne Nebenwirkungen zu (zuerst „Überfärbung“, dann „Entfärbung“).

---

<sup>8</sup>z. B. Lymphknotenaspirat, Fingerbeeren-Blutausstrich

<sup>9</sup>je nach vorgesehener Färbung mit Methanol (*Pappenheim*) oder Äthanol (PAS etc.) oder Formalindampf (Peroxidase)

Alle kommerziell erhältlichen Färbelösungen für die *Pappenheim*-Färbung enthalten nicht nur die erforderlichen Stoffe Methylenblau, AzurB und Eosin, sondern viele Nebenprodukte; chromatographisch gereinigte Produkte haben sich nicht durchgesetzt. Bei der Produktion wird lediglich das Färbe-Ergebnis durch Vergleich mit einem als „richtig“ angesehen Ergebnis kontrolliert.

Unsere Färbeprozedur ergab nur mit den Färbelösungen von *Merck* ein gutes und zuverlässiges Ergebnis, die Versuche mit Lösungen anderer Hersteller waren enttäuschend. Wir haben seit 15 Jahren keine alternativen Produkte getestet.

Wie *D.H. Wittekind*, Anatom an der Universität in Freiburg, uns persönlich mitteilte, kann der Anwender die Qualität der Färbung also lediglich durch eine rigoros kontrollierte Färbeprozedur und durch Vermeidung wechselnder Anbieter sichern. Seine experimentellen Untersuchungen der *Romanowsky-Giemsa*-artigen Färbungen sind beispielsweise in <sup>10</sup>, <sup>11</sup> und <sup>12</sup> publiziert.

Weil der *Romanowsky-Giemsa*-Effekt von einer guten alkoholischen Fixierung abhängt (Ausbleiben der rotblauen Färbung), legen wir auf eine gründliche Fixierung mit absolutem Methanol so großen Wert.

## Lösungen

1. May-Grünwald (*Merck* - Nr. 1424). Angebrochene Flasche binnen max. 4 Wochen aufbrauchen oder kleinere Flasche verwenden.
2. Giemsa (*Merck* - Nr. 9204). Angebrochenes Gebinde max. drei Monate haltbar.
3. Methanol (*Merck* - Nr. 6009). Achtung! Methanol ist hygroskopisch: sofort wieder verschließen; große Flaschen evtl. in mehrere kleine Flaschen aufteilen.
4. Puffer
  - a) aqua demineralisata 10l
  - b) NaOH (*Merck* Nr. 9140) 0.2 mol : 125 ml
  - c)  $KH_2PO_4$  (*Merck* Nr. 4873) 0.2 mol: 290 ml
  - d) Puffer auf pH 6.8 einstellen; etwa 2 Wochen haltbar<sup>13</sup>

---

<sup>10</sup>Wittekind DH, Kretschmer V: Histochem J. 1987 Jun-Jul;19(6-7):399-401 On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and the Romanowsky-Giemsa effect. II. A revised Romanowsky-Giemsa staining procedure

<sup>11</sup>Wittekind DH: On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view, Histochem J. 1983 Oct;15(10):1029-47

<sup>12</sup>Wittekind DH: On the nature of Romanowsky dyes and the Romanowsky-Giemsa effect Clin Lab Haematol. 1979;1(4):247-62

<sup>13</sup>die Verwendung von „Puffertabletten“ ohne pH-Kontrolle kann nicht empfohlen werden. Mit Tabletten produzierte Puffer müssen eventuell mit  $KH_2PO_4$  korrigiert werden

## Färbung

Dieses Rezept berücksichtigt die 1992 von der Firma *Merck* vorgenommene Änderung Zusammensetzung der *Giemsa*-Stammlösung.

1. 10 min Methanol (länger ist unschädlich, nicht kürzer!)
2. 7 min 1 (-2) Teile May-Grünwald + 1 Teil Puffer, dann filtrieren (eher mehr May-Grünwald als weniger!): („*alkoholische*“ Färbung)
3. keine Zwischenwässerung, nur abtropfen lassen
4. 20 min 1 Teil Giemsa + 6 Teile Puffer, dann filtrieren und dann eventuell mit  $KH_2PO_4$  auf pH 6.8 einstellen: („*wässrige*“ Färbung)
5. kurz (10 sec) eintauchen in Puffer
6. 4 min in Puffer („Differenzierung“)
7. 3 min in Puffer<sup>14</sup>

Grundsätzlich und wegen der 1992 geänderten Zusammensetzung der *Giemsa*-Stammlösung muss in jedem Labor gelegentlich geprüft werden, ob bei einem pH des Puffers von 6.8 die fertig verdünnte Giemsa-Lösung noch diesen pH hat. Sonst den pH des Puffers verändern (zumeist Korrektur zum sauren hin erforderlich).

Angesetzte Färbelösung (z. B. 400 ml) verwendbar für 5 Durchgänge mit je 30 Präparaten. Lösungen täglich neu ansetzen. Präparate brauchen im Bad nicht bewegt zu werden. Methanol- und Färbekuvetten stets abdecken. Methanol täglich frisch!

Das Färbegeschirr nicht mit Spülmitteln reinigen, sondern nur mit dem Methanolabfall, denn Detergenzienreste in dem meist porösen Glas der Kuvetten und der Färbegestelle können fatale Artefakte verursachen! Leichte Blaufärbung des Färbegeschirrs nach Reinigung ist ohne Bedeutung, da die verbliebenen Farbreste keine Färbepotenz mehr besitzen.

## Nachbehandlung

- Unterseite des noch feuchten Objektträgers abwischen.
- an der Luft trocknen.
- bei Farbrückständen im Präparat (schlechte Nachwässerung, nicht ganz in Lösung eingetauchte Präparate während der Färbung etc.: nach etwa 1 Tag kurzes Abwischen des ganzen Präparats auch auf der Objektseite mit Methanol möglich.

---

<sup>14</sup>länger, wenn ein kleiner Behälter verwandt wird, oder wenn beim Abwischen des Objektträgers (s.u.) blaue Farbe abgeht

### **Eindecken**

Präparate mit *Entellan*<sup>®</sup> unter Verwendung von Xylol (bitte keine „Ersatz-Mittel“ verwenden!) als Lösungsmittel eindecken, wenn mit Objektiven 20\* oder 40\* ohne Ölimmersion gearbeitet werden soll, oder wenn die Präparate für Kurse oder Mikrophotographie benötigt werden. Die Färbung bleibt ohne Eindecken länger stabil (wenn die Präparate bei Lichtabschluss gelagert werden), die Präparate sind allerdings kratzempfindlich. Bereits eingedeckte Präparate können durch langes „Einweichen“ in Xylol ausgedeckt und dann auch nachgefärbt werden (s.u. Nachfärbung).

### **Aufbewahrung**

Luftgetrocknete Präparate sind etwa zwei Wochen ohne Verlust an Qualität haltbar; mit Methanol fixiert ca. sechs Monate (dann Färbeprozedur mit saurer Fixation beginnen, s.u.); gefärbt mit oder ohne Deckglas mehr als 30 Jahre ohne Verlust, wenn die Präparate lichtgeschützt aufbewahrt werden (eigene Beobachtung).

### **Nachfärbung / Neufärbung**

Unzureichend gefärbte oder abgeblasste *Pappenheim*-gefärbte Präparate können auch nach vielen Jahren neu *Pappenheim*-gefärbt werden: Zuerst in angesäuertem Methanol/Puffer-Gemisch (1:1) mit 1 % Essigsäure-Gehalt so lange entfärben, bis keine Farbe mehr sichtbar ist (das kann bei Bröckel-haltigen Präparaten Stunden dauern). Dann neu färben. Dabei sind die Erythrozyten häufig grünlich gefärbt, die kernhaltigen Zellen aber korrekt gefärbt. Häufig erhält man hier bessere Ergebnisse, wenn die Fixationslösung der *Pappenheim*-Färbung ebenfalls mit 1 % Essigsäure angesäuert ist.

### **Überprüfung**

Die Färbung sollte zumindest an einem Blutausschlag, besser noch an einem Blutausschlag und einem Bröckel-haltigen Präparat überprüft werden. Der Hintergrund zwischen den Zellen (Eiweiß-haltig) darf allenfalls ganz leicht gelb-rosa gefärbt sein. Ein Grünstich oder Blaustich bei den Erythrozyten weist auf einen falschen pH hin. Die rötlichen Granula der Thrombozyten liegen gut sichtbar in einem gering bis mittelgradig stark blau gefärbten Zytoplasma. Die Granula der Granulozyten sind kräftig angefarbt, je nach Typ neutrophil (d. h. mehr rötlich als bläulich) oder basophil (d. h. stark angefarbt mehr blaubraun als rötlich) oder eosinophil (d. h. leuchtend und kräftig orange) angefarbt. Die

Zellen in den Bröckeln sollten ebenso angefärbt sein wie im freien dünneren Ausstrich-Anteil. Wenn in den Bröckeln die Färbung schwächer ist, weist das entweder auf eine unzureichende Trocknung vor der Färbung hin oder auf eine unzureichende Fixierung (zu kurz oder Methanol verwässert) oder auf eine zu kurze Färbe-Zeit.

### **Fotografie**

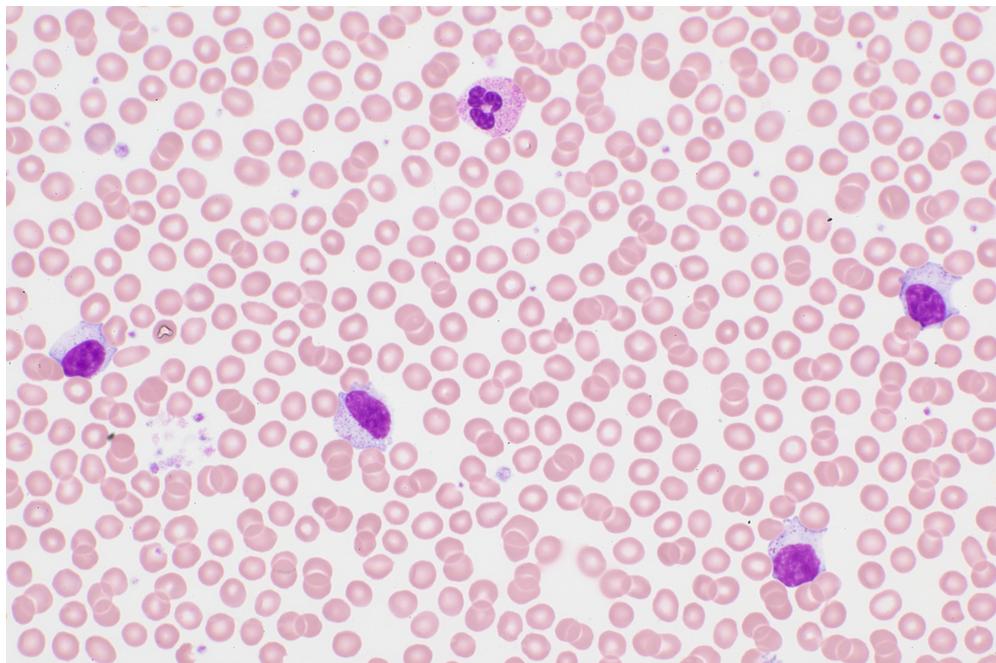
Die photographische Darstellung ist (im Gegensatz zu der reinen Giemsa-Färbung und zu anderen „üblichen“ Färbungen) sehr problematisch: Die dunklen Partien werden rot-blau übersättigt dargestellt, so dass alle Strukturen überdeckt werden. Das Problem tritt auf bei Video-Mikroskopie, bei Photographie auf Diafilm und bei der digitalen Photographie. Bei der digitalen Photographie kann das Problem durch Anwendung eines spezialisierten Farbmanagements und durch eine Bearbeitung der Gradationskurve behoben werden. Die eosinophilen Granula werden mit fast allen Videokameras und digitalen Kameras nicht leuchtend orange, sondern violett-orange schmutzig und nicht leuchtend dargestellt; auch dies ist nur durch das Farbmanagement zu beheben.

### **Färbeartefakte**

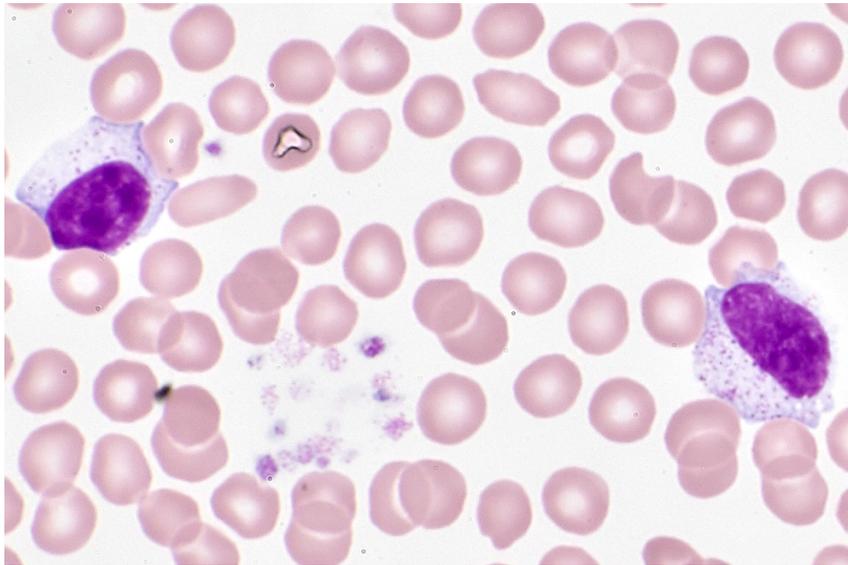
Abweichungen vom korrekten Ergebnis werden durch falsche Vorbereitung der Probe und durch falsche Färbung verursacht.

- blau-grau-grün verfärbte Erythrozyten — altes unfixiertes Präparat ( $\geq$  1-2 Wochen). Präparate können 1-2 Tage aufbewahrt werden ohne nennenswerte Veränderungen
- blau-grau verfärbte Erythrozyten, rot-Töne zu schwach — Präparat mit Citrat anstatt EDTA antikoaguliert (bei hoher Citrat-Konzentration)
- roter Hintergrund und rote Bröckel, Kerne blau anstatt blaurot — Präparat mit Heparin antikoaguliert (auch bei geringer Heparin-Konzentration!)
- blau-grün verfärbte Erythrozyten — pH der Färlösungen oder des Puffers zu hoch
- schwach angefärbte oder fehlende Granula der Granulozyten und der Thrombozyten, blasse Zytoplasmata — alte Färbungslösungen ( $\geq$  48 Stunden)
- dichte Areale (Bröckel) unterfärbt, dünne Areale, Blutausstriche etc. aber gut gefärbt — Fixation fehlt (Fixation durch den Alkohol auch einer unverdünnten *May-Grünwald*-Lösung reicht nicht aus!)
- „Kristalle“ in den Erythrozyten — verwässerte Fixation, noch nicht ganz trockene Objektträger (mit dem Auge betrachtet soeben trocken reicht nicht aus!)

**Beispiel einer korrekten Färbung**



**Abbildung 0.1:** Blutausstrich eines Patienten mit T-LGL–Leukämie  
Details in der Abbildung 0.2 auf der nächsten Seite



**Abbildung 0.2:** Blutausstrich eines Patienten mit T-LGL-Leukämie; die Ausschnitte zeigen die Granula eines neutrophilen Granulozyten und der Thrombozyten