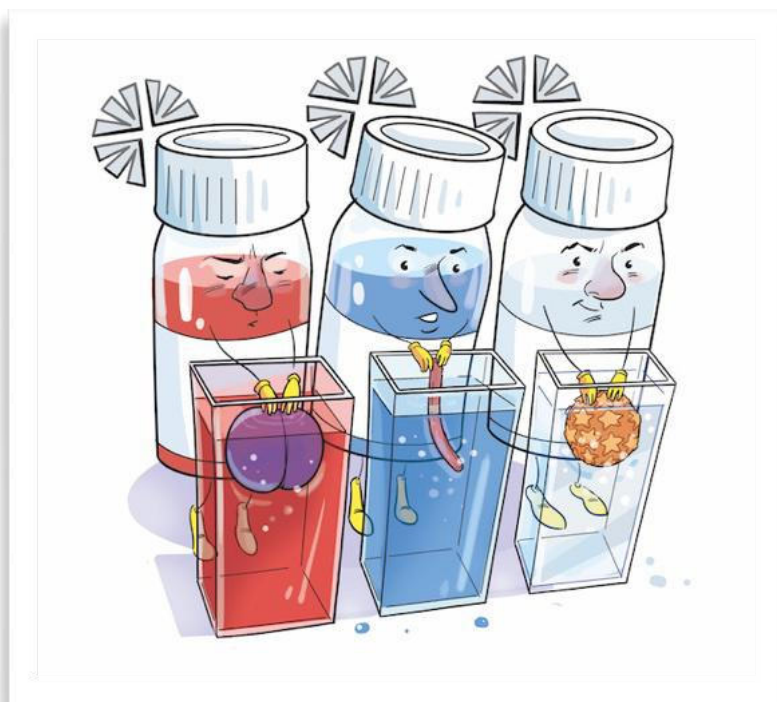


# Die Färbung nach Pappenheim

Protokoll optimiert mit **BIOMED Hemafix®**

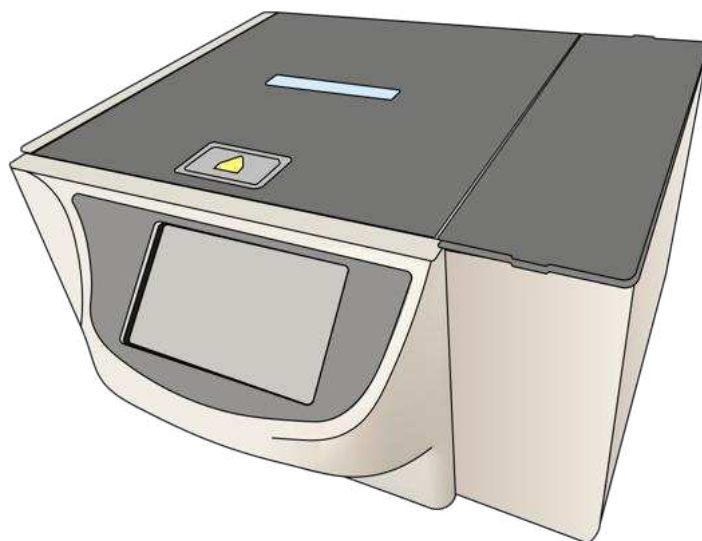
---

Ein Whitepaper der BIOMED Labordiagnostik GmbH



## Inhaltsverzeichnis

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| 1. Einführung .....                                  | 3  |
| 2. Material.....                                     | 4  |
| 2.1. Präparate .....                                 | 4  |
| 2.2. Färbelösungen .....                             | 5  |
| 2.3. Zusätzlich benötigte Materialien.....           | 5  |
| 3. Methode .....                                     | 6  |
| 3.1. Fixierung .....                                 | 6  |
| 3.2. Manuelle Färbung .....                          | 6  |
| 3.3. Färbung in Färbegeräten von Dagatron.....       | 7  |
| 3.4. Eindecken zur Stabilisierung .....              | 8  |
| 4. Analyse und Bewertung .....                       | 9  |
| 4.1. Analyse .....                                   | 9  |
| 4.2. Färbeergebnisse .....                           | 9  |
| 4.3. Bewertung .....                                 | 11 |
| 5. Tipps und Troubleshooting.....                    | 12 |
| 5.1. Tipps zur Anwendung der Pappenheimfärbung ..... | 12 |
| 5.2. Troubleshooting .....                           | 13 |



## 1. Einführung

Die mikroskopische Analyse eines Blutausstriches lässt Rückschlüsse über die Struktur von Blutzellen zu, die bei der automatischen Zählung und Differenzierung allein nicht erfasst werden können.

Die klinische Interpretation jeder zytologischen Färbung erfolgt anhand des Erscheinungsbildes und des Färbeverhaltens und somit der Morphologie der Zellstrukturen. Sie sollte durch passende Kontrollen ergänzt und innerhalb des Zusammenhangs der klinischen Geschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Facharzt bewertet werden.



Die **Färbung nach Pappenheim** wird als panoptische (alles sehende) oder panchromatische (empfindliche für alle Farben) Färbung bezeichnet, da in einer Kombinationsfärbung basophile, neutrophile und eosinophile (auch: azidophile, oxyphile) Zellstrukturen dargestellt werden. Saure oder anionische Farbstoffe wie Eosin färben positiv geladene Zellstrukturen, z.B. Proteine, während basische oder kationische Farbstoffe wie Methylenblau negativ geladene Zellbestandteile, wie beispielsweise die Nukleinsäuren, färben. Neutrophile Bestandteile der Zellen lassen sich sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen anfärben. Die Pappenheim-Färbung ist eine Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung und kann entsprechend auch als MGG (**May-Grünwald-Giemsa**) Färbung bezeichnet werden.

Der pH-Wert ist ein entscheidender Faktor bei der Färbung, so dass jede Veränderung des pH-Werts, der genauen Zusammensetzung der Färbelösung und der verwendeten **Puffer** zu einer abweichenden Färbereaktion führen kann. Der geeignete pH-Wert liegt je nach Art des Präparats (Knochenmark, Blut, andere) zwischen pH 5,8 und pH 7,2. Bei der Auswahl des geeigneten Puffers muss immer die Art des Präparats und das Ziel der Färbung berücksichtigt werden.

**May-Grünwald** ist eine pH-abhängige Differentialfärbung für luftgetrocknete Blutausstriche, Knochenmark, histologische und zytologische Präparate. Sie kombiniert die Wirkung von Eosin, Methylenblau und Methanol.

Die **Giemsa**-Färbelösung ist eine Weiterentwicklung der Romanowsky-Färbung und besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol. Sie wird auch als Azur-Eosin-Methylenblaulösung bezeichnet und kann als erweiterte Übersichtsfärbung für methanolfixierte Knochenmark- und Blutausstriche oder anderes zytologisches Material (z. B. Urinsediment oder Sputum) eingesetzt werden. Die Dauer der Färbung, der pH-Wert der Lösung, die verwendeten Puffer sowie die Fixierung können das Färberegebnis beeinflussen.

Die Pappenheim-Färbung nutzt die Wirkung beider Färbelösungen und deckt so das Spektrum der Giemsa- und der May-Grünwald-Färbung ab. Sie bewirkt die pH-abhängige Färbung der Granulozyten (polymorphkernige Leukozyten: neutrophile, eosinophile und basophile) und die spezifische Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas. So ermöglicht sie die Differenzierung von Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten, der verschiedenen Granulozyten und Thrombozyten, aber auch von im Blut vorkommenden Parasiten und Mikroorganismen.

Die Hemafix® **Schnellfärbung** basiert auf einer Modifikation der Pappenheim-Färbemethode und kann pH-unabhängig ohne den Einsatz von Pufferlösungen angewendet werden.

Die Färbung kann im Tauch- oder Injektionsverfahren, manuell oder mit einem Färbeautomaten durchgeführt werden.

## 2. Material

### 2.1. Präparate

Die Pappenheim-Färbung ermöglicht zuverlässig die Anfärbung luftgetrockneter Ausstriche von Körperflüssigkeiten und Geweben. Sie ist geeignet für dünne Präparate wie Blutausstriche oder Zytozentrifugenpräparate, für Präparate mit Anteilen von Gewebe wie Knochenmarkausstriche und für dichtere Präparate wie durch Biopsie oder Punktion entnommene Gewebeproben der Organzytologie oder Lymphknotenzytologie.

Die Hemafix® Schnellfärbung (modifizierte Pappenheim-Methode) ist gut geeignet für eine schnelle Übersichtsfärbung von Blutausstrichen.

Alle Proben sind nach dem Stand der Technik und den anerkannten Labormethoden zu entnehmen, zu behandeln, vorzubereiten und zu trocknen.



Als Probenmaterial für Blutausstriche wird frisches kapillares oder venöses, mit EDTA koagulierte Blut empfohlen. Mit Na-Citrat, Na-Oxalat bzw. Heparin versetzte Proben eignen sich nicht für diese Untersuchungen, da diese Antikoagulanzen die Färbung teilweise schwerwiegend verfälschen können. Das Kapillarblut sollte sofort, das venöse Blut spätestens 3 Stunden nach Probenahme ausgestrichen und luftgetrocknet werden.

Entscheidend für die Auswertung gefärbter Präparate ist die Ausstrichqualität. Wichtig ist die Verwendung fettfreier und sauberer Objektträger. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Ausstrichtechnik. Hierbei wird ein kleiner Blutropfen auf einer Seite eines beschrifteten Objektträgers aufgebracht (ca. 1,5 cm vom Rand entfernt), ein zweiter Objektträger mit geschliffenen Kanten wird im Winkel von 45° vor dem Blutropfen angesetzt und dann vorsichtig in den Blutropfen geführt. Sobald sich das Blut über die ganze Kante verteilt hat, wird der zweite Objektträger in unverändertem Winkel kontinuierlich über den ersten Objektträger geschoben. Die Bewegung muss gleichmäßig und zügig erfolgen. Es dürfen keine Stufen im Ausstrich entstehen. Ein gut ausgestrichenes Präparat zeigt am Ende, wo der Objektträger schliesslich abgehoben wird, ein bartförmiges Ausfransen des Blutmaterials.

Die Dicke des Ausstrichs hängt vom Winkel zwischen dem ersten und zweiten Objektträger ab: Je kleiner der Winkel, desto dünner wird der Ausstrich. Lässt man auf dem getrockneten Ausstrich Licht reflektieren, sollte er grünlich erscheinen. Erscheint er rot, ist er zu dick geraten. Zu hastige Bewegungen beim Ausstreichen können zum Abriss des Flüssigkeitsfilms führen. Erst wenn der Ausstrich sorgfältig an der Luft getrocknet worden ist, kann er gefärbt werden.

Spätestens 24 - 48 Stunden nach Ausstrich sollte die Färbung begonnen werden, um eine wesentliche Änderung des Färbeverhaltens zu vermeiden. Für eine spätere Färbung sollten die Präparate sofort nach der Lufttrocknung der Präparatdicke entsprechend ausreichend lang fixiert werden.



Die nachfolgenden Protokolle sind für dünne bis mitteldicke Ausstrichpräparate.

Zytologische Proben können frische Knochenmarkausstriche oder klinisch-zytologisches Material wie Urinsediment, Sputum etc. sein. Geeignet sind auch Abstriche von Feinnadelaspirations-biopsien und Spülungen.

Für die Analyse von Liquor-Sediment sollte Liquor (auch: Liquor cerebrospinalis, cerebrospinal fluid, CSF) sofort (bis 1 h nach Entnahme) prozessiert werden. Liquor ist eine klare, zellarme Flüssigkeit. Die häufigsten Zellen im Liquor gesunder Personen sind Lymphozyten, seltener Monozyten. Erhöhte Zahlen von Leukozyten oder das Auftreten von Erythrozyten im Liquor weisen auf eine Erkrankung hin.

## 2.2. Färbelösungen

Färbung nach der **Pappenheim**-Methode:

Fixierlösung: z.B. Hemafix® Fixierlösung  
May-Grünwald-Lösung: z.B. Hemafix® May-Grünwald  
Giemsa-Lösung: z.B. Hemafix® Giemsa  
Pufferlösung nach Weise: z.B. Hemafix® Puffer pH 7.2

**Schnellfärbung** modifiziert nach Pappenheim:

Fixierlösung: z.B. Hemafix® Fixierlösung  
Erste Färbung: z.B. Hemafix® Rot  
Zweite Färbung: z.B. Hemafix® Blau



## 2.3. Zusätzlich benötigte Materialien



Die zusätzlich benötigten Materialien müssen geeignet sein und den Anforderungen an ein medizinisch-diagnostisches Labor gerecht werden.

- Kapillaren zur Blutentnahme
- Fettfreie, saubere Objektträger
- Eventuell Deckgläser in geeigneter Größe und Eindeckmedium (Mounting Medium), z. B. Euparal oder Entellan
- Durchlichtmikroskop für die medizinische und biologische Anwendung in Laboren
- Eventuell Immersionsöl
- Färbeküvetten oder ein geeignetes Färbegerät

Das vorliegende Protokoll wurde manuell in Färbeküvetten und an dem Färbeautomaten Dagatron DX-300 getestet.



### 3. Methode

Sowohl die Färbung nach Pappenheim als auch die Schnelfärbung können grundsätzlich im Injektions- oder Tauchverfahren durchgeführt werden. Die Lösungen werden entsprechend auf das Präparat aufgetragen oder das gesamte Präparat wird in die Lösung getaucht.

#### 3.1. Fixierung

Die luftgetrockneten Präparate werden möglichst bald nach der Trocknung (spätestens nach 24 - 48 h) durch eine methanolhaltige Fixierlösung fixiert. Die Präparate werden hierfür schnell mit der Fixierlösung bedeckt oder darin eingetaucht, gefolgt von einer Inkubation von 10 min. Für dickere Präparate sollte die Dauer der Fixierung erhöht werden.

Bei geplanter späterer Färbung sollte das Präparat getrocknet werden, sonst kann direkt die Färbung folgen.

#### 3.2. Manuelle Färbung

Die manuelle Färbung kann in Färbeküvetten oder durch Auftragen der Lösungen mit Hilfe einer Pipette durchgeführt werden. Bei einer größeren Anzahl von Präparaten empfiehlt sich der Gebrauch von Färbeküvetten, bei wenigen ist die Methode des Auftrages mit Hilfe einer Pipette sparsam und daher zu bedenken. Das folgende Protokoll ist mit Hemafix®-Lösungen optimiert worden, kann jedoch auch mit anderen Färbelösungen angewendet werden. Die verwendeten Färbelösungen müssen nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und eingesetzt werden.

##### Pappenheim-Färbung

Die Lösungen Hemafix® Fixierlösung und Hemafix® Puffer pH 7.2 sind gebrauchsfertig. Die Färbelösung Hemafix® May-Grünwald wird mit Hemafix® Puffer pH 7.2 im Verhältnis 1:2 verdünnt (1 Teil Hemafix® May-Grünwald + 1 Teil Hemafix® Puffer). Hemafix® Giemsa wird im Verhältnis 1:10 (entsprechend 1 Teil Hemafix® Giemsa + 9 Teile Hemafix® Puffer) verdünnt.

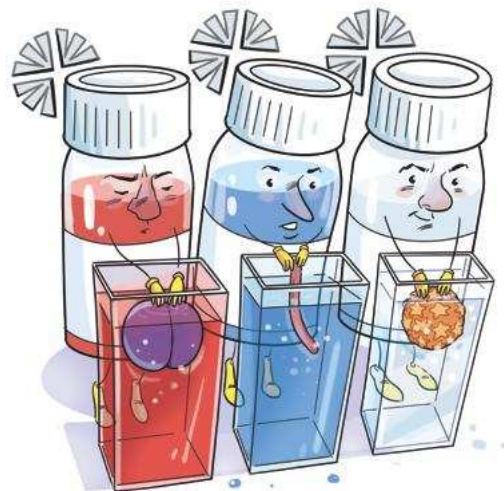
Die jeweils benötigte Menge der Lösungen Hemafix® May-Grünwald und Hemafix® Giemsa sollten für die manuelle Durchführung mit einem Faltenfilter gefiltert werden, um Artefaktbildung zu vermeiden.

Empfohlene Färbezeiten für Pappenheimfärbung:

- Fixierung in Fixierlösung für ca. 2 min.
- Inkubation in May-Grünwald-Lösung für ca. 3 min.
- Einige Sekunden spülen in Pufferlösung nach Weise (pH 7,2)
- Inkubation in Giemsa-Lösung für ca. 15 min.
- Einige Sekunden spülen in Pufferlösung nach Weise (pH 7,2)
- Für einige Sekunden spülen in Aqua dest.
- Lufttrocknen der Präparate.

Die Inkubationszeiten der Färbelösungen müssen individuell angepasst werden je nach Ausstrichdicke und Probenmaterial.

Wenn eine längere Lagerung der Präparate gewünscht ist, können Sie mit Hilfe eines Eindeckmediums und eines passenden Deckglases eingedeckt und so haltbar gemacht werden.



### Schnellfärbung modifiziert nach Pappenheim

Die Lösungen Hemafix® Fixierlösung, Hemafix® Rot und Hemafix® Blau sind gebrauchsfertig, sie sind abgepuffert und ergeben keine Farbänderung durch pH-Wert-Verschiebungen (Wasser u.a.). Die jeweils benötigte Menge der Lösungen Rot und Blau für die Hemafix® Schnellfärbung sollten für die manuelle Durchführung mit einem Faltenfilter gefiltert werden, um Artefaktbildung zu vermeiden.

Empfohlene Färbezeiten für Schnellfärbung:

- Fixierung in Fixierlösung für ca. 10 sec.
- Inkubation in Hemafix® Rot für ca. 10 sec.
- Inkubation in Hemafix® Blau für ca. 10-18 sec.
- Kurz spülen in Aqua dest.
- Lufttrocknen der Präparate.

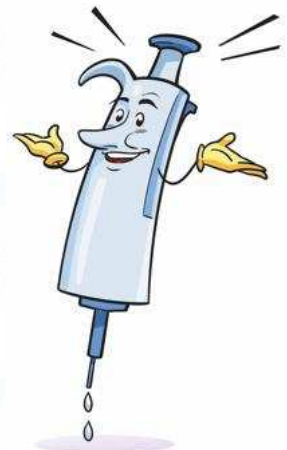
Die Inkubationszeiten der Färbelösungen müssen individuell angepasst werden je nach Ausstrichdicke und Probenmaterial.

Wenn eine längere Lagerung der Präparate gewünscht ist, können Sie mit Hilfe eines Eindeckmediums und eines passenden Deckglases eingedeckt und so haltbar gemacht werden.

### 3.3. Färbung in Färbegeräten von Dagatron

In den Färbegeräten von Dagatron läuft die Färbung inklusive Trocknung aufgrund der geräteeigenen Programmierung automatisch ab. Die Injektion der Färbelösungen im Gerät erfolgt analog zum Auftrag mit einer Pipette bei der manuellen Färbung. Es ist die gleichzeitige Färbung von bis zu 10 oder, bei zusätzlichem Objektträgerrad, bis zu 20 Präparaten möglich. Das Färbeprogramm ist bereits im Gerät vorinstalliert, es ist jedoch die individuelle Einstellung der Injektions- und Inkubationszeit möglich. Die jeweils zuletzt verwendeten Färbezeiten werden für die nächste Färbung erneut eingesetzt.

Das folgende Protokoll ist mit Hemafix®-Lösungen optimiert worden, kann jedoch auch mit anderen Färbelösungen in den Originalflaschen von Dagatron angewendet werden. Die verwendeten Färbelösungen müssen nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und eingesetzt werden.



### Pappenheim-Färbung

Die Lösungen Hemafix® Fixierlösung und Hemafix® Puffer pH 7.2 sind gebrauchsfertig.

Die Färbelösung Hemafix® May-Grünwald wird mit Hemafix® Puffer pH 7.2 im Verhältnis 1:2 verdünnt (1 Teil Hemafix® May-Grünwald + 1 Teil Hemafix® Puffer).

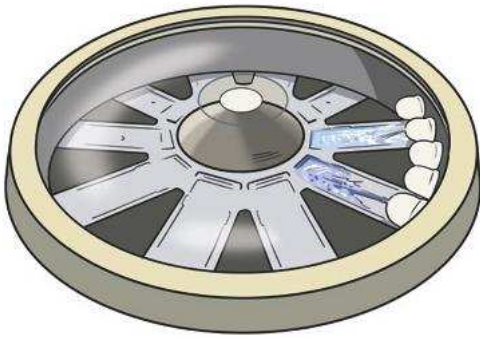
Hemafix® Giemsa wird im Verhältnis 1:10 (entsprechend 1 Teil Hemafix® Giemsa + 9 Teile Hemafix® Puffer) verdünnt.

### Schnellfärbung modifiziert nach Pappenheim

Die Lösungen Hemafix® Fixierlösung, Hemafix® Rot und Hemafix® Blau sind gebrauchsfertig, sie sind abgepuffert und ergeben keine Farbänderung durch pH-Wert-Verschiebungen (Wasser u.a.).

Ein Filtern der Lösungen vor der Anwendung ist für die Injektionsmethode mittels Dagatron Färbegerät nicht erforderlich, da das Dagatron Färbesystem eingebaute Reagenzienfilter aufweist.





Nach Ausstrich und Fixierung der Proben auf den Objektträgern werden diese einzeln auf die Objektträgerhalter im Objektträgerrad des Färbegeräts platziert. Bei Multi-Stainern muss die gewünschte Färbemethode ausgewählt und dann der Schalter „STAIN“ betätigt werden. Das Färbegerät führt automatisch den programmierten Färbeprozess durch (siehe auch Bedienungsanleitung des Färbegeräts). Nach erfolgreicher Färbung muss das Präparat lediglich einer Analyse im Mikroskop unterzogen werden, um die verschiedenen Blutzellen nach Farbe und Struktur zu differenzieren.

Wenn eine längere Lagerung der Präparate gewünscht ist, können Sie mit Hilfe eines Eindeckmediums und eines passenden Deckglases eingedeckt und so haltbar gemacht werden.

### 3.4. Eindecken zur Stabilisierung

Bei der Fertigstellung der Präparate für für histologische, zytologische oder hämatologische Untersuchungen kann als letzter Schritt das Eindecken der Präparate mit einem passenden Deckglas erfolgen. Um ein Verschieben des Deckglases gegen den Objektträger zu verhindern, wird das Deckglas mit Hilfe eines Eindeckmediums auf dem Objektträger fixiert. Dies verbessert die Handhabung der Präparate, ermöglicht aber auch die längerfristige Lagerung der fixierten Präparate, da das Eindeckmittel die Probe vor Schädigung durch Feuchtigkeit, Sauerstoff und Lichteinwirkung schützt. Trotzdem sollten klassisch gefärbte, mikroskopische Präparate trocken, lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert werden, um eine lange Haltbarkeit der Präparate zu erreichen. Hierfür sind beispielsweise Objektträger-Mappen aus Pappe oder Kunststoff beziehungsweise Objektträger-Kästen aus Kunststoff oder Holz geeignet.





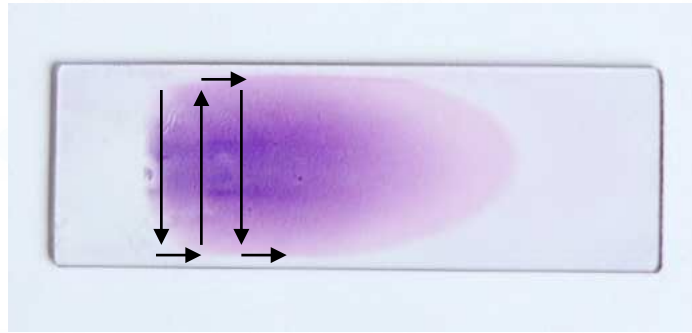
## 4. Analyse und Bewertung

### 4.1. Analyse

Zunächst kann die Betrachtung der Qualität des Präparats makroskopisch erfolgen, hierbei wird anhand der Güte und Dicke des Ausstrichs der zu analysierende Bereich festgelegt. Eine erste, oberflächliche Beurteilung der Färbung bezüglich Stärke der Färbung und Gleichmäßigkeit ist auch bereits möglich.

Die genauere Beurteilung der Präparate sollte mit einem geeigneten Durchlichtmikroskop erfolgen. Bei geringer Vergrößerung (Objektiv 10x oder 20x) kann die Ausstrichqualität und die Färbegüte festgestellt werden. Entscheidend ist, dass die Zellen möglichst vereinzelt, also wenig überlagert, liegen und auch nicht beim Ausstrich mechanisch zerstört wurden. Der geeignete Bereich für die Differenzierung der Zellen kann definiert werden.

Bei höherer Vergrößerung (Objektiv 50x oder 100x, sofern möglich Ölimmersion) kann die Differenzierung der Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Färbung erfolgen. Um wiederholte Analyse des selben Bereichs zu verhindern, wird das Präparat in einem mäanderndem Muster gescreent.



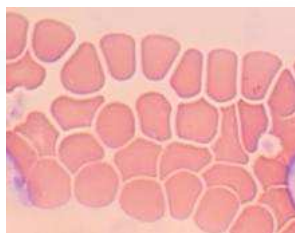
### 4.2. Färbeergebnisse

Mit Hilfe der Pappenheim-Färbung und der hämatologischen Schnellfärbung modifiziert nach Pappenheim können verschiedene Zelltypen und Zellstrukturen differenziert werden:

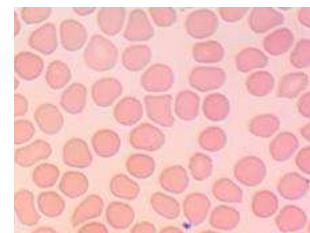
- **Erythrozyten:** 99 % der Blutzellen  
Form: Bikonkave, runde Scheiben  
Größe:  $\varnothing$  6 - 8  $\mu\text{m}$ , Dicke 1 - 2  $\mu\text{m}$



Schnellfärbung



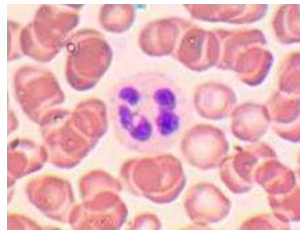
Pappenheim



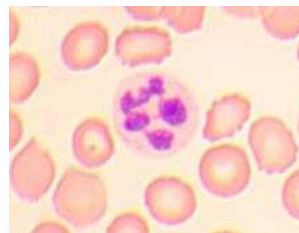
Pappenheim



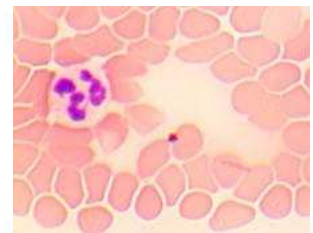
- **Leukozyten:** 1 % der Blutzellen
- **Granulozyten:** 60 - 70 % der Leukozyten:  
Form: Kugelförmig
- **Neutrophile:** 50 - 65 % der Leukozyten  
Größe: 9 - 15 µm  
Granula: - Primäre (azurophile, saure Granula)  
- Sekundäre ("spezifische Granula", reagieren nicht mit basischen oder sauren Farbstoffen)  
- 3 weitere Granula  
Kern: - Stabkernige (stabförmiger, unsegmentierter Kern, "junge" Zellen)  
- Segmentkernige (2 - 5 Segmente, ausgereifte Zellen)



Schnelfärbung

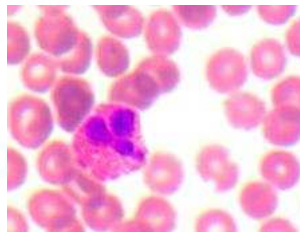
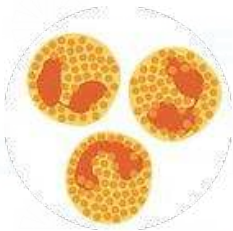


Pappenheim

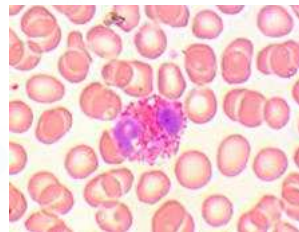


Pappenheim

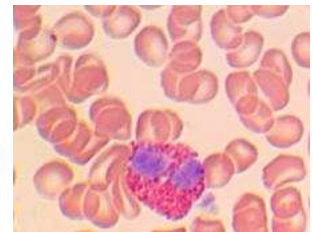
- **Eosinophile:** 2 - 5 % der Leukozyten  
Größe: 8 - 10 µm  
Granula: Zahlreich, groß, eosinophil (rot-orange in der Färbung)  
Kern: Stabförmig oder (meist) doppelt-segmentiert



Schnelfärbung



Pappenheim

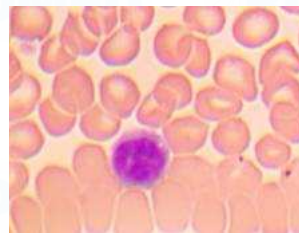


Pappenheim

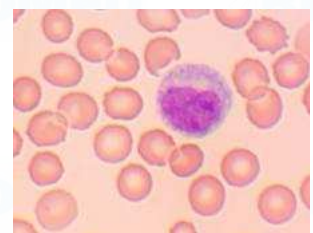
- **Basophile:** 0 - 2 % der Leukozyten  
Form: Rund bis oval  
Größe: ~10 µm  
Granula: Intrazellulär, basophil (blau-violett), zahlreich und grob, verdecken oft den Zellkern  
Kern: Meist plump segmentiert



Schnelfärbung



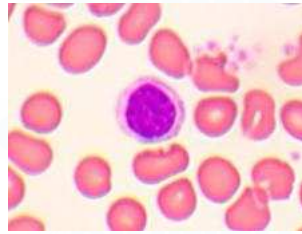
Pappenheim



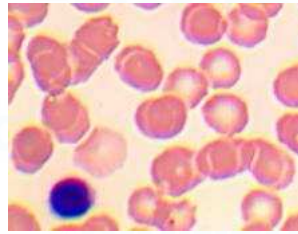
Pappenheim



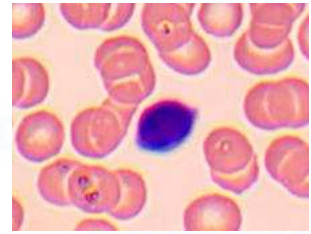
- **Lymphozyten:** 20 - 30 % der Leukozyten  
Form: Rund-oval  
Größe: 8 - 10  $\mu\text{m}$   
Kern: Rund, relativ groß (selten eingebuchtet)



Schnellfärbung

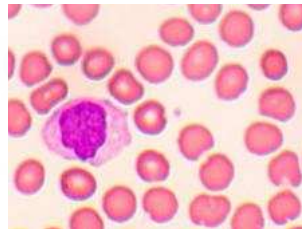


Pappenheim

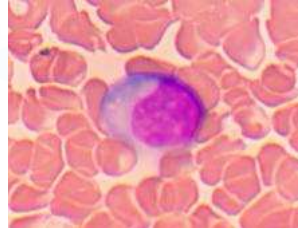


Pappenheim

- **Monozyten:** 2 - 6 % der Leukozyten  
Form: Vorwiegend rund  
Größe: 12 - 20  $\mu\text{m}$  (größte Zellen im Blut)  
Kern: Vielgestaltig, kugel- oder bohnenförmig



Schnellfärbung

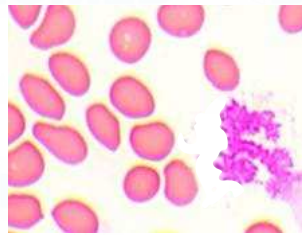


Pappenheim

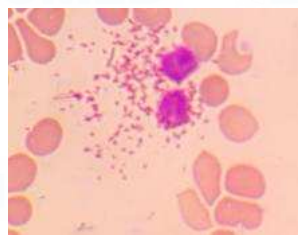


Pappenheim

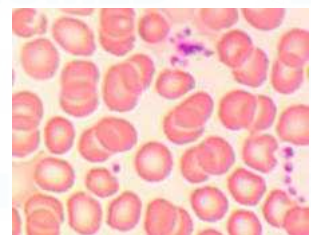
- **Thrombozyten:** 150.000-350.000 Blutplättchen pro  $\mu\text{l}$  Blut  
Form: Flache, unregelmäßige runde bis ovale Plättchen  
Größe: 1 - 4  $\mu\text{m}$  (kleinste Zellen im Blut)  
Kern: Kernlose Zytoplasmafragmente



Schnellfärbung



Pappenheim



Pappenheim

#### 4.3. Bewertung

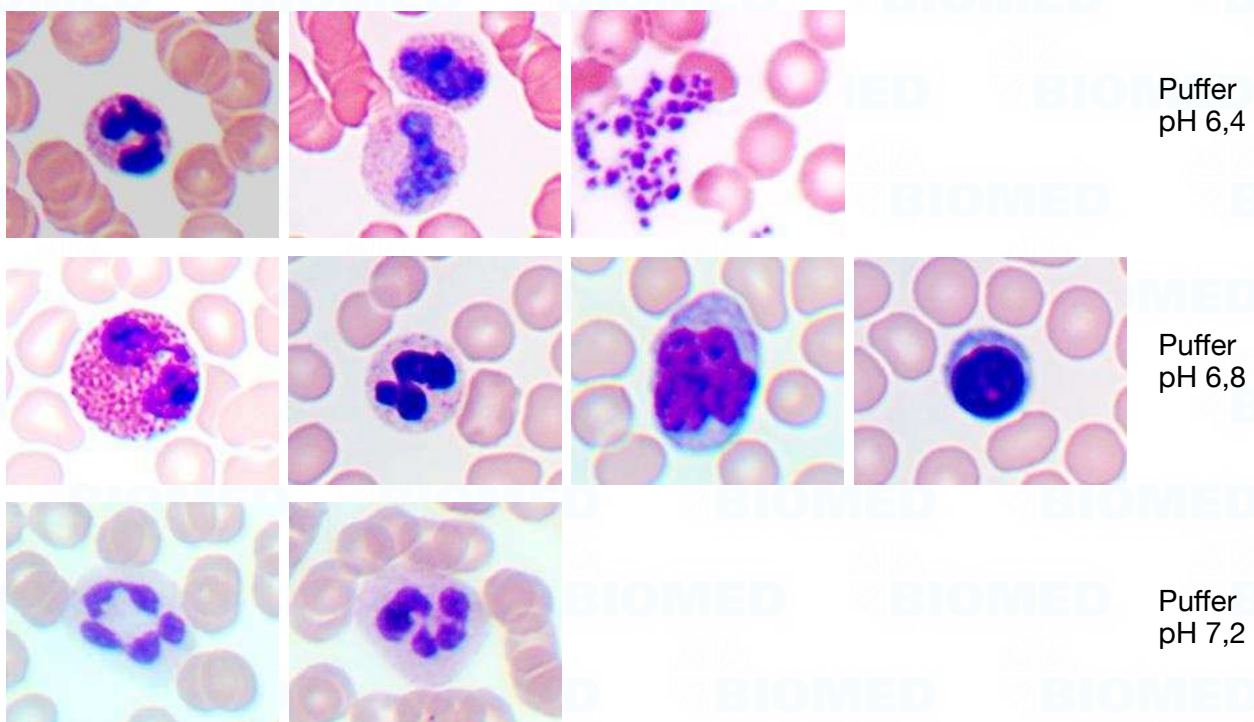
Die Bewertung der Präparate erfolgt nach der üblichen, laborinternen Routine. Bezüglich der Erythrozyten können beispielsweise Formveränderungen, mögliche Erythrozyteneinschlüsse und Farbveränderungen oder auch Änderungen der kernhaltigen roten Vorstufen (Erythroblasten) festgestellt werden. Neben der Ermittlung der relativen Anteile einzelner Leukozyten-subtypen an den Gesamtleukozyten können in der mikroskopischen Untersuchung morphologische Merkmale der Zellen erkannt werden, welche wichtige Hinweise auf reaktive Geschehen (z.B. Infekte) aber auch auf neoplastische Prozesse (z.B. Leukämien) geben können.

## 5. Tipps und Troubleshooting

### 5.1. Tipps zur Anwendung der Pappenheimfärbung

- Sowohl die Farbstoffe, als auch die Präparatdicke haben einen Einfluss auf die Intensität der Färbung, daher sollte die Färbedauer an die jeweiligen Bedingungen angepasst werden.
- Ungenügende Spülung während des Färbvorgangs oder schmutzige bzw. fettige Objektträger können zu ungenauer Färbung des Präparats führen.
- Die Präparate müssen immer vollständig und gleichmäßig mit Färbelösung benetzt werden, um eine gleichmäßige, reproduzierbare Färbung ohne Lücken zu erhalten.
- Alte oder nicht filtrierte Färbelösungen können zur Bildung von Artefakten führen. Daher ist es stets sinnvoll, vor der Durchführung einer Färbung die Qualität der Färbelösungen zu überprüfen. Hierzu gehört die visuelle Prüfung auf Trübung und Verunreinigung der Lösungen beispielsweise durch Wachstum von Mikroorganismen bei unsachgemäßer Aufbewahrung.
- Bei längerem Stehen der Färbelösungen in Küvetten ist es sinnvoll, die Färbelösungen vor dem nächsten Gebrauch zu mischen oder zu filtrieren, um Artefaktbildung zu verhindern.
- Färbelösungen im Gebrauch sollten nach spätestens 3 Tagen, die Pufferlösung am Besten nach jedem Färbedurchgang gewechselt werden.
- Bei Einsatz eines Färbegeräts muss unbedingt die Anleitung des Herstellers beachtet werden.
- Der pH-Wert der Pufferlösung hat einen starken Einfluss auf die Färbung, daher sollte er gemäß Rili-BÄK, Tabelle B 3-1 – Interne Qualitätssicherung wöchentlich überprüft werden. Eine leichte Verschiebung des pH-Werts kann die Reaktion der Zellbestandteile auf die Färbelösungen insofern beeinflussen, als beispielsweise ein basisch reagierender Zellbestandteil sauer reagieren kann und umgekehrt.

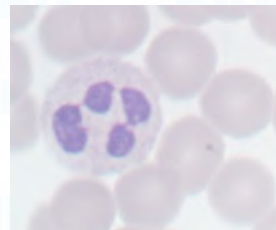
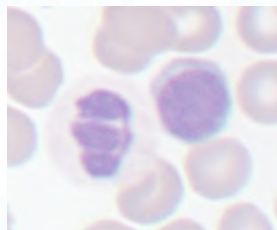
Je niedriger der pH-Wert des Puffers bei der Färbung, desto stärker ist die (saure) Rotfärbung und Methylenblau wird ausgewaschen.



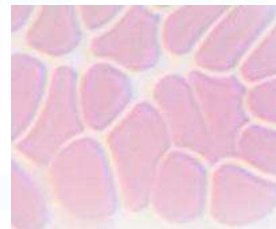
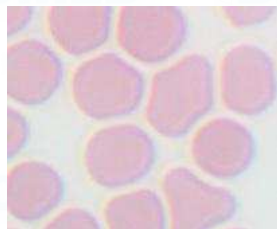


## 5.2. Troubleshooting

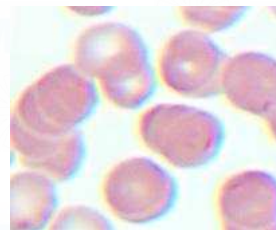
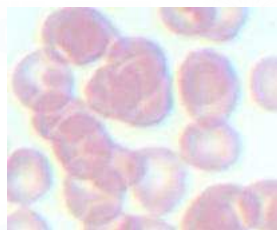
- Die Färbung ist zu blass (Kerne, Erythrozyten, Granula) - mögliche Ursachen:
  - zu kurze Färbung
  - zu dickes Präparat
  - zu starke Spülung
  - zu alte/verbrauchte Färbelösung
  - ungeeignete Färbezeiten



- Die Färbung ist zu rot (Erythrozyten leuchtend rot):
  - Ansäuerung der Färbung, z.B. durch pH-Veränderung in Puffer- oder Färbelösungen
- Die Färbung ist zu blau (Chromatin, Granula):
  - zu dickes oder altes Präparat
  - zu lange Färbung
  - zu schwache Spülung
  - zu hoher pH-Wert einzelner Lösungen (auch Aqua dest möglich!)
- Die Zellen erscheinen zu groß, Erythrozyten ohne Delle:
  - Ausstrich zu dünn



- Die Zellen erscheinen zu klein, überlappen:
  - zu dickes Präparat



- Artefakte sind sichtbar
  - Färbelösungen wurden nicht filtriert
  - mechanische Zerstörung der Zellen beim Ausstreichen
  - unzureichende/verwässerte Fixierung
  - unzureichende Trocknung des Präparats
  - fehlerhafte Lagerung der Probe (zu lang/gekühlt)

Herausgegeben am: 11.09.2025

Herausgeber:

BIOMED Labordiagnostik GmbH  
Bruckmannring 32  
D-85764 Oberschleißheim

Phone: + 49 89 315 700 0  
Fax: + 49 89 315 700 15

Mail: [info@biomed.de](mailto:info@biomed.de)  
Web: [www.biomed.de](http://www.biomed.de)

