

POUŽITÍ

Barvivo Wright Stain je určeno k barvení krevních filmů a filmů kostní dřevě. Roztoky jsou určeny k použití v "diagnostice in vitro"

Wrightovo barvivo je modifikované barvivo Romanowského a používá se k diferenčnímu barvení buněčných částic krve. Při barvení krevních filmů popsaným postupem se jádra a cytoplazma bílých krvinek zabarvují do modra až růžova. Kombinace purifikovaných barviv v preparátech ACCUSTAIN Wrightova barviva eliminuje nekonzistentnost barvení a poskytuje reprodukovatelnost chromogenické odezvy jednotlivých částí.

Postupy v tomto letáku popisují použití barviva Wright Stain jako manuální barvení ponořováním nebo hromadné barvení na barvicích automatech, například Hemastainer dodávaný Geometric Data, Midas II dodávaný EM Diagnostic Systems, Inc. a Fisher Stainmaster dodávaný Fisher Scientific

REAGENCIE

WRIGHT STAIN, MODIFIED, katalogové č. WS

Wrightovo barvivo, modifikováno, 0,3 % w/v, uferováno při pH 6,8, v methanolu.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

FOSFÁTOVÝ PUFER, katalogové č. P3288

Směs fosforečnanu sodného a fosforečnanu draselného, 0,0083 M/L, pH 7,2

PROMÝVACÍ ROZTOK 2, katalogové č. RS 2

Roztok ethanolu, 18 % smáčeďlo. Obsahuje 0,02 % azidu sodného jako konzervačního činidla.

METHANOL, BEZ ACETONU, katalogové č. M 1775

Mikroskopická / sklíčka / Krycí sklíčka

ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte roztoky Wright při pokojové teplotě (18–26 °C). Štítek reagentie uvádí datum použitelnosti.

Skladujte fosfátový pufr, promývací roztok 2 a methanol při pokojové teplotě (18–26°C).
Skladujte pracovní roztok fosfátového pufru při 2–8°C. Před použitím zahřejte

ZHORŠENÍ:

Zlikvidujte Wrightovo barvivo, jestliže se objeví sraženina. Zlikvidujte pracovní roztok fosfátového pufru, jestliže je zakalen nebo viditelně bakteriologicky znečištěn.

PŘÍPRAVA:

Roztok Wright Stain se dodává připraven k okamžitému použití, avšak Wrightovo barvivo lze při použití na barvicím přístroji zředít. Viz následující návod.

Fosfátový pufr (P3288) se připraví zředěním 1 lahvičky pufru v 3,8 litrech deionizované vody. Dobře promíchejte, aby se rozpustil.

Methanol je připraven k okamžitému použití.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagentii. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

US Prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Wright Stain je HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Dráždí oči a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení – zákaz kouření. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Promývací roztok Rinse Solution 2 je VZNEĚTLIVÝ a ŠKODLIVÝ. Hořlavý. Škodlivý při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Udržujte mimo zdrojů zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. Azid sodný může reagovat s olovem a mědí a vytvářet vysoce hořlavé sloučeniny. Zasažené orgány: Nervy a játra.

Fosfátový pufr. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Methanol je HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: Možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení – zákaz kouření. Přijměte příslušná bezpečnostní opatření proti výbojům statické elektřiny. Zamezte kontaktu s kůží. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti (Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná)

Wrightovo barvivo a methanol jsou VYSOCE HOŘLAVÉ a TOXICKÉ. Vysoce hořlavý. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: Možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení – zákaz kouření. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Promývací roztok Rinse Solution 2 je DRÁŽDIVÝ. Hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Udržujte mimo zdrojů zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Fosfátový pufr. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Měly by se používat čerstvé filmy celé krve nebo čerstvé filmy z krve antikoagulované v EDTA. Před přípravou filmů je třeba krev řádně promíchat při pokojové teplotě (18–26 °C). Filmy je třeba připravit během 1 hodiny od odběru krve. Pokud se sklíčka nebarví v den odběru, je třeba je fixovat v absolutním methanolu a uchovávat v čisté nádobě.

POZNÁMKY:

1. K dosažení větších buněčných detailů lze prodloužit čas barvení. Barva (tóny modré nebo červené) se bude lišit při zvýšení nebo snížení času působení v deionizované vodě.
2. Rychlé (15 sekund) barvení se nedoporučuje pro filmy s kostní dřeví. Uspokojivé výsledky s těmito preparáty se dosahují barvením po dobu 1–3 minuty a 2–6 minuty v deionizované vodě.
3. Pro hromadné barvení se doporučují stojany na sklíčka a nádoby Tissue-Tek® výrobce Miles Scientific, protože tento systém umožňuje umístit sklíčka do vertikální polohy.
4. Barevnost může být při zvýšení nebo snížení času působení v deionizované vodě různá. Kostní dřeví je třeba barvit po dobu nejméně 90 sekund a pufovat po dobu 90 sekund až 3 minuty.
5. Postup barvení popsaný v tomto letáku poskytoval v naší laboratoři uspokojivé výsledky. Individuálními preferencím lze vyhovět úpravou těchto časů.
6. Časy pro ruční barvení lze použít i pro barvicí automat Hemastainer podobou otáčení v klidové pozici.
7. Nastavení časů je různé v závislosti na individuálních preferencích. (Automatické postupy)
8. Voda k promývání musí být deionizovaná voda. (Automatické postupy)
9. Pokud deionizovaná voda nemá neutrální pH, doporučuje se použít fosfátový pufr, pH 7,2, katalogové č. P 3288.
10. Do každého cyklu musí být zařazena sklíčka s pozitivní kontrolou.
11. Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP:

I. Metoda ponořování (rychlá – ruční)

1. Vložte asi 50 ml barviva WRIGHT STAIN do nádoby Coplin.
POZNÁMKA: UCHOVÁVEJTE PEVNĚ UZAVŘENÉ. Vyměřte, objevují-li se na krvinkách vodní artefakty nebo když se objeví sraženina.
2. Naplňte další nádobu Coplin deionizovanou vodou.
3. Vložte dobře usušené krevní filmy, drážkou DOLŮ, do barviva WRIGHT STAIN na asi 15 sekund.
POZNÁMKA: Rychlé ponoření na 5–10 sekund sníží tvorbu vodních artefaktů na filmech, které nebyly řádně usušeny.
4. Vyměňte sklíčka z barviva a umístěte je do deionizované vody, drážkou DOLŮ, na asi 30 sekund. NETŘEPEJTE SE SKLÍČKY PO DOBU JEJICH UMÍSTĚNÍ V DEIONIZOVANÉ VODĚ.
5. Opláchněte rychle v tekoucí deionizované vodě a před vyhodnocením řádně vysušte na vzduchu.

II. Horizontální metoda barvení (ruční)

1. Vložte dobře usušené krevní filmy do příslušného stojanu na sklíčka.
2. Zalijte sklíčka 1–2 ml barviva WRIGHT STAIN.
3. Po 30 sekundách, bez promývání barviva WRIGHT STAIN z kroku 2, přidejte stejné množství deionizované vody a opatrným foukáním na sklíčka řádně promíchejte.
4. Po 1 minutě řádně opláchněte deionizovanou vodou a usušte na vzduchu.

Hromadné barvení na barvicím automate Hemastainer

1. Nastavte časovače tak, aby byly zajištěny následující časy pro každou stanicí:
Stanice 1 – 30 sekund
Stanice 2 – 2 minuty
Stanice 3 – 3,5 minuty
Stanice 4 – 30 sekund
Stanice 5 – Vynechat a přejít na "usušit na vzduchu"
2. Připravte stanice k barvení následujícím způsobem:
Stanice 1 – absolutní methanol, 500 ml
Stanice 2 – ACCUSTAIN Wright Stain, 350 ml a 150 ml absolutního methanolu
Stanice 3 – 500 ml fosfátového pufru, pH 7,2
Stanice 4 – 3,8 L deionizované vody a 100 ml fosfátového pufru
Stanice 5 – prázdná
3. Otočte přepínač elektrického proudu do polohy ZAPNUTO.
4. Nastavte ovladač Automaticky-ručně do polohy RUČNĚ.
5. Nastavte přepínač Vpravo/vlevo do polohy VLEVO.
6. Otočte přepínač elektrického proudu do polohy ZAPNUTO.
7. Otočte přepínač vývěvy do polohy AUTOMATICKY.
8. Naplňte přepravku dobře usušenými krevními filmy.
9. Připojte do závěsu a utáhněte.
10. Spusťte cyklus nastavením ovladače Automaticky-ručně do polohy AUTOMATICKY.
11. Když je cyklus ukončen a sklíčka řádně usušena, nastavte ovladač Automaticky-ručně do polohy RUČNĚ. Přepravka se vrátí do výchozí polohy.

Hromadné barvení na barvicím automatu Fisher Stainmaster

Nastavte program následujícím způsobem:

Případ	Stanice	Reagencie	Čas (Minuty)
1	1	Absolutní methanol	0,5
2	2	Wright Stain, Modified, katalogové č. WS-128	1,5
3	3	Fosfátový pufr katalogové č. P 3288	1,0
4	6	Deionizovaná voda	0,3
5	5	Promývací roztok Rinse Solution 2, katalogové č. RS 2	0,7
6	4	Deionizovaná voda	0,3
7	Sušení	vzduchem	5,0

Hromadné barvení na barvicím automatu Midas II

Nastavte program následujícím způsobem:

Krok	Lázeň	Reagencie	Čas (Sekundy)
1	1	Absolutní methanol	30
2	2	Wright Stain, Modified, katalogové č. WS-128	60-90
3	3	Fosfátový pufr katalogové č. P 3288	60
4	4	Tekoucí deionizovaná voda	10
5	Sušení	vzduchem	3 minuty nebo až je suché

Nepoužitě lázně lze vynechat.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Jádra budou zabarvena různými odstíny červené. Cytoplazmatické zabarvení bude vykazovat různé odstíny modré až světle růžové. V cytoplazmě některých buněk se mohou objevit jemně načervenalé až fialové granuly. Basofily vykazují tmavě modro černé granule v cytoplazmě. Eosinofily vykazují jasně oranžové granule v cytoplazmě. Červené krvinky by měly být růžové až oranžové.¹

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

1. Hematology: Principles and Procedures, Sixth Edition, Brown AB, Lea & Febiger, Philadelphia 1993 p101

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. WS
Předchozí revize: 2003-09
Revidováno: 2010-06



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Velká Británie

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103USA 314-771-5765
Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122
nebo e-mailujte na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, N mecko 49-7329-970