

VERWENDUNGSZWECK

Der Wright-Farbstoff wird zum Färben von Blut- oder Knochenmarkfilmen verwendet. Die Lösungen dienen zur „In-vitro-Diagnostik“.

Der Wright-Farbstoff ist ein modifizierter Romanowsky-Farbstoff, der zur unterschiedlichen Färbung zellulärer Elemente im Blut dient. Wenn Blutfilme wie im Verfahren beschrieben gefärbt werden, nehmen Zellkerne und Zytoplasma der weißen Blutzellen eine typische blaue oder rosarote Färbung an. Die gereinigten Farbstoffe in den ACCUSTAIN-Formulierungen des Wright-Farbstoffs beseitigen inkonsistente Färbungen und führen zu einer reproduzierbaren chromogenen Reaktion mit verschiedenen Chargen.

Die Verfahren dieser Packungsbeilage beschreiben die Verwendung des Wright-Farbstoffs als manuellen, flüssigen Farbstoff zur Eintauchfärbung oder zur stapelweisen Färbung in Färbesystemen wie dem Hemastainer von Geometric Data, dem Midas II von EM Diagnostic Systems, Inc. und dem Fisher Stainmaster von Fisher Scientific.

REAGENZIEN

WRIGHT-FARBSTOFF, MODIFIZIERT, Bestell-Nr. WS
Wright-Farbstoff, modifiziert 0,3 Gew.%, gepuffert bei pH 6,8 in Methanol.

SPEZIELL ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN:

PHOSPHATPUFFER, Bestell-Nr. P 3288
Eine Mischung aus Natriumphosphat und Kaliumphosphat, 0,0083 mol/l, pH 7,2.

SPÜLLÖSUNG 2, Bestell-Nr. RS 2
Ethanolösung, 18%, des Netzmittels. Enthält 0,02% Natriumazid als Konservierungsmittel.

METHANOL, AZETONFREI, Bestell-Nr. M 1775

Mikroskop / Objektträger / Deckgläser

AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT:

Die Wright-Lösungen bei Raumtemperatur (18–26 °C) aufbewahren. Das Verfallsdatum ist auf dem Reagenzietikett angegeben.

Die Phosphatpuffer, Spüllösung 2 und Methanol bei Raumtemperatur (18–26 °C) aufbewahren.

Die Phosphatpuffer-Arbeitslösung bei 2–8 °C aufbewahren. Vor Gebrauch erwärmen.

PRODUKTVERFALL:

Die Wright-Färbelösung entsorgen, falls sich ein Präzipitat bildet. Die Phosphatpuffer-Arbeitslösung entsorgen, falls sie sich trübt oder eine bakterielle Besiedlung vorhanden ist.

VORBEREITUNG:

Die Wright-Färbelösung ist gebrauchsfertig, kann jedoch verdünnt werden, wenn sie auf einem automatisierten Instrument verwendet wird. Siehe nachstehende Anweisungen.

Der Phosphatpuffer (P3288) sollte durch Verdünnen von 1 Fläschchen Puffer mit 3,8 Liter entionisiertem Wasser zubereitet werden. Zum Auflösen gut mischen.

Methanol ist gebrauchsfertig.

VORSICHTSMASSNAHMEN:

Bei der Handhabung von Laborreagenzien sollten normale Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen, staatlichen und nationalen Vorschriften befolgen. Aktuelle Hinweise zu Risiken, Gefahren und Sicherheitsmaßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

US-Gefahren- und Sicherheitsangaben

Wright-Farbstoff ist ENTZÜNDLICH und TOXISCH. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Reizt Augen und Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Spüllösung 2 ist BRENNBAR und SCHÄDLICH. Entzündlich. Schädlich bei Verschlucken. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Handschuhe tragen. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren reagieren und hochexplosive Verbindungen bilden. Zielorgane: Nerven und Leber.

Phosphatpuffer. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

Methanol ist ENTZÜNDLICH und TOXISCH. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Toxisch: Gefahr schwerer, irreversibler Schäden bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Reizt Augen und Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Vorsichtsmaßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen. Kontakt mit Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

EU-Gefahren- und Sicherheitsangaben (Vorsicht: Substanzen sind noch nicht vollständig geprüft)

Wright-Farbstoff und Methanol sind HOCHENTZÜNDLICH und TOXISCH. Hochentzündlich. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Toxisch: Gefahr schwerer, irreversibler Schäden bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Spüllösung 2 ist ein REIZMITTEL. Entzündlich. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Phosphatpuffer. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

PROBENNAHME:

Es wird empfohlen, die Probenahme gemäß NCCLS-Dokument M29-A2 durchzuführen. Keine Testmethode kann eine absolute Gewähr dafür liefern, dass Blut- und Gewebeproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate und Gewebeproben als potenziell infektiös behandelt werden.

Es müssen frische Filme aus Vollblut oder mit EDTA antikoaguliertem Blut verwendet werden. Vor der Zubereitung der Filme muss das Blut bei Raumtemperatur (18–26 °C) gründlich vermischt werden. Die Filme sollten innerhalb von 1 Stunde nach der Blutentnahme zubereitet werden. Falls sie nicht am gleichen Tag gefärbt werden, sollten Objektträger in reinem Methanol fixiert und in einem staubfreien Behälter aufbewahrt werden.

HINWEISE:

- Um eine detailliertere Färbung zu erhalten, kann die Färbezeit verlängert werden. Die Farbe (Blau- oder Rottöne) kann durch Verlängern oder Verkürzen der Zeit im entionisierten Wasser variiert werden.
- Für Knochenmark wird keine schnelle Färbung (15 Sekunden) empfohlen. Für solche Präparate geben 1–3 Minuten im Farbstoff und 2–6 Minuten in entionisiertem Wasser befriedigende Ergebnisse.
- Für die Stapelfärbung werden Objektträgerhalter empfohlen, wie sie z.B. von Miles Scientific für den Tissue-Tek® geliefert werden, da das System eine senkrechte Aufstellung der Objektträger ermöglicht.
- Die Farbe kann durch Verlängern oder Verkürzen der Zeit im entionisierten Wasser variiert werden. Knochenmark sollte mindestens 90 Sekunden gefärbt und 90 Sekunden bis 3 Minuten gepuffert werden.
- Die oben angegebenen Zeiten führten in unseren Labors zu befriedigenden Ergebnissen. Je nach persönlichen Vorlieben können diese Zeiten angepasst werden.
- Die Zeiten des manuellen Verfahrens können auch mit dem Hemastainer verwendet werden, wenn sich der Swing-Schalter in der OFF-Position befindet.
- Die Zeiten können den einzelnen Vorlieben angepasst werden. (automatisierte Verfahren)
- Es sollte mit entionisiertem Wasser gespült werden. (automatisierte Verfahren)
- Falls das entionisierte Wasser keinen neutralen pH-Wert aufweist, empfehlen wir, Phosphatpuffer, pH 7,2, Bestell-Nr. P 3288, zu verwenden.
- In jedem Durchlauf sollten positive Kontroll-Objektträger getestet werden.
- Die aus diesem Verfahren gewonnenen Daten dienen nur als Hilfe zur Diagnose und sollten im Zusammenhang mit anderen klinischen Diagnostiktests und Informationen überprüft werden.

VERFAHREN:

I. Tauchmethode (schnell – manuell)

- Ungefähr 50 ml WRIGHT-FARBSTOFF in eine Coplin-Küvette geben.
HINWEIS: BEI NICHTGEBRAUCH FEST VERSCHLOSSEN AUFBEWAHREN.
Ersetzen, falls in roten Zellen Wasserartefakte erscheinen oder sich ein Präzipitat bildet.
- Eine andere Coplin-Küvette mit entionisiertem Wasser füllen.
- Den vollständig getrockneten Blutfilm mit dem Federrand nach UNTEN ungefähr 15 Sekunden in den WRIGHT-FARBSTOFF stellen.
HINWEIS: Ein schnelles Eintauchen von 5–10 Sekunden kann Wasserartefakte auf nicht ganz trockenen Filmen reduzieren.
- Die Objektträger aus der Farbe nehmen und für ca. 30 Sekunden in entionisiertes Wasser stellen, mit Federrand nach UNTEN. DEN OBJEKTRÄGER NICHT BEWEGEN, WÄHREND ER SICH IM ENTIONISIERTEN WASSER BEFINDET.
- Kurz unter entionisiertem Wasser spülen und vor der Untersuchung gründlich an der Luft trocknen lassen.

II. Horizontale Färbemethode (manuell)

- Den vollständig getrockneten Blutfilm auf einen geeigneten Probenhalter geben.
- Den Objektträger mit 1–2 ml WRIGHT-FARBSTOFF überschwemmen.
- Nach 30 Sekunden, ohne den Wright-Farbstoff aus Schritt 2 abzuspülen, ein gleiches Volumen entionisiertes Wasser hinzufügen und durch behutsames Blasen auf dem Objektträger gut vermischen.
- Nach 1 Minute gründlich unter entionisiertem Wasser spülen und an der Luft trocknen lassen.

Stapelfärbung im Hemastainer Färbesystem

- Die Timer einstellen, um die folgenden Zeiten für die einzelnen Stationen vorzugeben:
Station 1 – 30 Sekunden
Station 2 – 2 Minuten
Station 3 – 3,5 Minuten
Station 4 – 30 Sekunden
Station 5 – Auslassen und mit „Lufttrocknen“ weiterfahren
- Die Stationen wie folgt zum Färben vorbereiten:
Station 1 – Reines Methanol, 500 ml
Station 2 – ACCUSTAIN Wright-Farbstoff, 350 ml und 150 ml reines Methanol
Station 3 – 500 ml Phosphatpuffer, pH 7,2
Station 4 – 3,8 l entionisiertes Wasser und 100 ml Phosphatpuffer
Station 5 – Leer lassen
- Netzschalter auf ON stellen.
- Den Auto-Manual-Schalter auf MANUAL einstellen.
- Den Right/Left-Schalter auf LEFT einstellen.
- Den Swing-Schalter auf ON stellen.
- Den Pumpenschalter auf AUTO stellen.
- Den Korb mit vollständig luftgetrockneten Blutfilmen bestücken.
- Den Korb an der Hängevorrichtung anbringen und befestigen.
- Den Vorgang starten, indem der Auto/Manual-Schalter auf AUTO gestellt wird.
- Wenn der Vorgang abgeschlossen ist und die Objektträger vollständig trocken sind, den Auto/Manual-Schalter auf MANUAL stellen. Der Korb geht dann in die Ausgangsposition zurück.

Stapelfärbung im Fisher Stainmaster Färbesystem

Das Programm wie folgt einstellen:

Vorgang	Station	Reagenz	Zeit (Minuten)
1	1	Methanol, Absolut	0,5
2	2	Wright-Farbstoff, Modifiziert, Bestell-Nr. WS-128	1,5
3	3	Phosphatpuffer, Bestell-Nr. P 3288	1,0
4	6	Entionisiertes Wasser	0,3
5	5	Spüllösung 2, Bestell-Nr. RS 2	0,7
6	4	Entionisiertes Wasser	0,3
7	Trocknen	Luft	5,0

Stapelfärbung mit dem Midas II Färbesystem

Das Programm wie folgt einstellen:

Schritt	Bad	Reagenz	Zeit (Sekunden)
1	1	Methanol, Absolut	30
2	2	Wright-Farbstoff, Modifiziert, Bestell-Nr. WS-128	60-90
3	3	Phosphatpuffer, Bestell-Nr. P 3288	60
4	4	Fließendes entionisiertes Wasser	10
5	Trocknen	Luft	3 Minuten oder bis trocken

Nicht verwendete Bäder können ausgelassen werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Zellkerne werden in unterschiedlichen Violetttönen gefärbt. Das Zytoplasma wird in unterschiedlichen Tönen von Blau bis hellem Rosarot gefärbt. Im Zytoplasma einiger Zelltypen können feine rote bis violette Granula vorhanden sein. Basophile Zellen weisen dunkelblaue bis schwarze Granula im Zytoplasma auf. Eosinophile Zellen weisen hellorange Granula im Zytoplasma auf. Rote Blutzellen sollten rosarot bis orange erscheinen.¹

Falls sich die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen unterscheiden, bitte den technischen Kundendienst von Sigma-Aldrich verständigen.

LITERATURANGABEN

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

Sigma-Aldrich, Inc. gewährleistet, dass ihre Produkte mit den Angaben in dieser und anderen Sigma-Aldrich-Publikationen übereinstimmen. Der Anwender entscheidet selbst über die Eignung des Produkts für den jeweiligen Einsatzzweck. Es können zusätzliche Geschäftsbedingungen gelten. Weitere Informationen zu den Verkaufsbedingungen finden Sie auf der Rückseite der Rechnung oder des Lieferscheins.

Verfahren-Nr. WS
Vorherige Ausgabe: 2003-09
Revidiert: 2010-06



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

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103USA +1 314 771 5765
Technischer Kundendienst: R-Gespräch +1 314 771 3122
oder Email an clintech@sial.com
Bestellungen: R-Gespräch +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Postfach 1120, 89552 Steinheim, Deutschland 49-7329-970