

USO PREVISTO

La Colorazione Reticolociti è idonea all'identificazione dei reticolociti su pellicole di sangue. I reagenti per la colorazione dei reticolociti sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro".

Nel 1949 Brecher¹ introdusse il nuovo metodo con blu di metilene per l'identificazione dei reticolociti, il quale si basava sulla precipitazione dell'RNA ribosomiale mediante il colorante cationico. Questa tecnica si è affermata sulle altre, diventando la procedura universalmente riconosciuta per la quantificazione dei reticolociti nel sangue periferico.²

Sigma-Aldrich fornisce una soluzione stabile per la colorazione dei reticolociti su pellicole di sangue. La soluzione per la colorazione dei reticolociti e il sangue vengono mescolati e messi ad incubare per un breve periodo a temperatura ambiente. Gli strisci vengono dapprima eseguiti sui vetrini per microscopio, quindi vengono asciugati all'aria ed esaminati con un microscopio a luce diretta ad immersione in olio. Un globulo rosso che risulti positivo dovrebbe contenere almeno due granuli colorati di blu.

REAGENTE

COLORAZIONE RETICOLOCITI, n. di catalogo R 4132

Nuovo blu di metilene, 1% (p/v); cloruro di sodio 0,9% (p/v); potassio ossalato 1,6% (p/v).

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare la colorazione per reticolociti a temperatura ambiente (18–26°C). Il reagente si mantiene stabile sino alla data di scadenza.

PREPARAZIONE

La colorazione per reticolociti è un prodotto che viene fornito pronto per l'uso.

PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A. e U.E.) – Attenzione: sostanze non ancora pienamente testate!

Il reagente per la colorazione dei reticolociti è IRRITANTE. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

PROCEDURA

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

È possibile raccogliere il sangue in provette standard, sottovuoto, per laboratorio clinico. Si possono utilizzare tutti gli anticoagulanti classici (ad esempio eparina, citrato e ossalato). L'anticoagulante ottimale è l'acido etilendiamminotetraacetico sale di tripotassio (EDTA K₃). Se la procedura non viene eseguita entro 2–3 ore dal prelievo, conservare il sangue a 4°C. Prima di applicare la colorazione, riportare il sangue a temperatura ambiente e mescolare. Non è consigliabile l'uso di sangue che è stato prelevato da più di 24 ore.

MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Microscopio
Strumento per strisci di sangue o citocentrifuga
Provette di vetro da 10x75 o 12x75mm
Contagocce da laboratorio oppure pipette Pasteur
Vetrini per microscopio e vetri coprioggetti

NOTE

Come normale operazione di controllo, si consiglia di analizzare strisci di sangue provenienti da donatori sani insieme ai campioni dei pazienti.

È possibile che si formi una modesta quantità di precipitato nella soluzione di colorazione per reticolociti. Se il precipitato è visibile, filtrare la soluzione con una carta da laboratorio idonea allo scopo.

I dati generati da questa procedura sono da utilizzarsi soltanto a sostegno della diagnosi e devono essere valutati congiuntamente ad altri esami e dati diagnostici.

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA) +1 314 771 5765

Assistenza tecnica: a carico del destinatario +1 314 771 3122

o tramite e-mail all'indirizzo clintech@sial.com

Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

PROCEDURA

1. In una provetta di vetro aggiungere tre gocce di sangue accuratamente miscelato e due gocce della soluzione colorante per reticolociti. Mescolare con cura. Lasciare riposare per 10 minuti a temperatura ambiente (18–26°C).
2. Preparare uno striscio classico e lasciare asciugare all'aria per almeno 15 minuti. Non è consigliabile applicare una colorazione di contrasto.
3. Applicare un vetro coprioggetti ed esaminare al microscopio.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Dopo la colorazione, le pellicole di sangue vengono esaminate una ad una in modo da appurare la presenza o assenza di reticolociti. La definizione "reticolocito" si applica a qualunque globulo rosso che contenga almeno due particelle di colore blu.²

Utilizzando un obiettivo ad immersione in olio 100x e un oculare 10x, selezionare in maniera random alcuni settori della pellicola in cui i globuli rossi sembrano vicini uno all'altro, ma non si toccano né si sovrappongono. Conteggiare 1000 globuli rossi contenenti reticolociti. La percentuale di reticolociti può essere calcolata come segue:

$$\text{Conteggio reticolociti (\%)} = \frac{\text{Numero totale di reticolociti}}{10}$$

I valori normali (adulti, livello del mare) sono $1,0 \pm 0,5\%$.²

Data la variabilità dell'ematocrito, potrebbe essere necessario correggere il conteggio reticolocitico osservato rispetto ad un ematocrito normale del 45%:

$$\text{Conteggio reticolociti corretto (\%)} = \text{Conteggio osservato} \times \frac{\text{Ematocrito misurato (\%)}}{45\%}$$

Nel caso di un paziente normale, non anemico, i reticolociti sono presenti nel sangue in circolazione nel quarto giorno della loro maturazione, dopo tre giorni di maturazione all'interno del midollo. Alcuni fattori che accentuano l'eritropoiesi potrebbero abbreviare il periodo di maturazione nel midollo, allungando così il periodo di maturazione nel sangue. Questo spostamento dei reticolociti fa sì che nel sangue sia presente un numero elevato di reticolociti "spostati". Questi ultimi non devono essere conteggiati nella quantificazione dei reticolociti, che invece mira a riflettere la produzione di globuli rossi.^{2,3} Le cellule spostate possono essere individuate mediante una pellicola sottoposta alla colorazione di Wright² e un indice di produzione reticolocitica² stabilito sulla base del conteggio di reticolociti corretto e l'ematocrito:

$$\text{Indice di produzione dei reticolociti} = \frac{\text{Conteggio dei reticolociti corretto (\%)}}{\text{Tempo di maturazione previsto (giorni)}}$$

Con il tempo di maturazione previsto illustrato di seguito:

Giorni	Ematocrito
1	45%
1,5	35%
2	25%
3	15%

Un indice di produzione dei reticolociti maggiore o uguale a 3 è da ritenersi normale, mentre un indice minore di 2 è da ritenersi al di sotto della norma.²

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

BIBLIOGRAFIA

1. Brecher G: New methylene blue as a reticulocyte stain. Am J Clin Pathol 19:895, 1949
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for Reticulocyte Counting, Proposed Standard. H16-P, Vol 5, No. 10, 1985
3. Perrotta AL, Finch CA: The polychromatophilic erythrocyte. Am J Clin Pathol 57:471, 1972

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. R 4132
Revisione precedente: 2003-03
Revisione: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD (Regno Unito)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim (Germania) 49-7329-970