

USO PREVISTO

La colorazione di Wright è idonea all'uso con le pellicole di sangue o midollo osseo. Le soluzioni sono riservate al solo "uso diagnostico in vitro".

La colorazione di Wright è una colorazione del tipo Romanowsky modificata, adatta a colorare in modo differenziale gli elementi cellulari del sangue. Quando le pellicole di sangue vengono sottoposte al trattamento descritto, il nucleo e il citoplasma dei globuli bianchi assumono un colore caratteristico blu o rosa. I coloranti purificati contenuti nelle formulazioni ACCUSTAIN della colorazione di Wright assicurano una colorazione omogenea e la riproducibilità delle risposte cromogeniche da lotto a lotto.

Le procedure illustrate in questo documento descrivono la colorazione di Wright secondo due modalità: l'immersione manuale nel colorante oppure l'uso di coloratori a lotti, ad esempio il sistema Hemastainer di Geometric Data, il sistema Midas II di EM Diagnostic Systems, Inc. e il sistema Fisher Stainmaster di Fisher Scientific.

REAGENTI

COLORAZIONE DI WRIGHT, MODIFICATA, n. di catalogo WS

Colorazione di Wright modificata 0,3% p/v; tamponata a pH 6,8 in metanolo.

MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

TAMPONE FOSFATO, n. di catalogo P 3288

Miscela di fosfato di sodio e fosfato di potassio 0,0083 mol/l; pH 7,2.

SOLUZIONE DI LAVAGGIO 2, n. di catalogo RS 2

Soluzione di etanolo 18%; agente umidificante. Contiene sodio azide (0,02%) come conservante.

METANOLO, SENZA ACETONE, n. di catalogo M 1775

Microscopio / Vetrini / Vetri coprioggetti

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare le soluzioni di Wright a temperatura ambiente (18–26°C). La data di scadenza è indicata sull'etichetta dei reagenti.

Conservare il tampone fosfato, la soluzione di lavaggio 2 e il metanolo a temperatura ambiente (18–26°C).

Conservare il tampone fosfato in soluzione di lavoro a 2–8°C. Riscaldare prima dell'uso.

DETERIORAMENTO

Eliminare le soluzioni per la colorazione di Wright nel caso in cui si formi un precipitato. Scartare il tampone fosfato in soluzione di lavoro se intorbidisce o se è visibile una crescita batterica.

PREPARAZIONE

La soluzione per la colorazione di Wright è fornita pronta per l'uso, anche se la può essere diluita se utilizzata con uno strumento automatico. Fare riferimento alle istruzioni riportate di seguito.

Preparare il tampone fosfato (n. di catalogo P3288) diluendo 1 fialone del tampone in 3,8 litri di acqua deionizzata. Mescolare con cura per sciogliere.

Il metanolo è 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.)

La colorazione di Wright è **INFIAMMABILE** e **TOSSICA**. Tossica per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Irritante per gli occhi e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

La soluzione di lavaggio 2 è **COMBUSTIBILE** e **NOCIVA**. Infiammabile. Nociva per ingestione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare guanti idonei. La sodio azide può reagire con il piombo e il rame formando composti metallici altamente esplosivi. Organi colpiti: nervi e fegato.

Tampone fosfato. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Il metanolo è **INFIAMMABILE** e **TOSSICO**. Tossico per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Irritante per gli occhi e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. Evitare l'accumulo di scariche elettrostatiche. Evitare il contatto con la cute. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

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

La colorazione di Wright e il metanolo sono **FACILMENTE INFIAMMABILI** e **TOSSICI**. Facilmente infiammabili. Tossici per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione.

Tossici: pericolo di effetti irreversibili per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi.

La soluzione di lavaggio 2 è **IRRITANTE**. Infiammabile. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi.

Tampone fosfato. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

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.

Utilizzare solo pellicole di sangue intero fresco oppure pellicole di sangue conservato in anticoagulante (EDTA). Prima di preparare le pellicole, è necessario miscelare accuratamente il sangue a temperatura ambiente (18–26°C). Le pellicole devono essere preparate entro 1 ora dal prelievo di sangue. Se i vetrini non vengono sottoposti alla procedura di colorazione in giornata, dovranno essere fissati in metanolo assoluto e conservati in un contenitore non impolverato.

NOTE

- Per ottenere un maggiore dettaglio cellulare, è possibile allungare il tempo della colorazione. Il colore (tonalità di blu o rosso) può essere variato aumentando o riducendo il tempo di immersione nell'acqua deionizzata.
- La colorazione rapida (15 secondi) è sconsigliata per il midollo osseo. Per questo tipo di preparato, è possibile ottenere risultati soddisfacenti con 1–3 minuti di immersione nel colorante e 2–6 minuti di immersione in acqua deionizzata.
- Per la colorazione a lotti si consiglia di utilizzare piatti e rack per vetrini del tipo prodotto da Miles Scientific per Tissue-Tek®, un sistema che consente il posizionamento dei vetrini in senso verticale.
- Il colore può essere variato aumentando o riducendo il tempo di immersione nell'acqua deionizzata. I vetrini di midollo osseo devono essere immersi nel colorante per almeno 90 secondi e quindi nel tampone per 1,5–3 minuti.
- I tempi di colorazione descritti nelle procedure citate hanno prodotto risultati soddisfacenti nei nostri laboratori. È possibile regolare questi tempi in base alle proprie preferenze personali.
- I tempi per la procedura manuale possono essere rispettati anche con il sistema Hemastainer, purché la levetta sia nella posizione Off.
- È possibile modificare i tempi in base alle proprie preferenze personali (procedure automatiche).
- Per il lavaggio è obbligatorio utilizzare acqua deionizzata (procedure automatiche).
- Se l'acqua deionizzata non ha pH neutro, consigliamo l'uso del tampone fosfato a pH 7,2 (n. di catalogo P 3288).
- Includere vetrini di controllo positivi in ogni seduta.
- 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.

PROCEDURA

I. Metodo ad immersione (rapido – manuale)

- Collocare circa 50 ml di COLORAZIONE DI WRIGHT in una vaschetta Coplin.
NOTA IL CONTENITORE DEVE ESSERE PERFETTAMENTE CHIUSO QUANDO NON È USATO. Procedere alla sostituzione se si nota la presenza di macchie d'acqua nei globuli rossi o se si forma un precipitato.
- Riempire un'altra vaschetta Coplin di acqua deionizzata.
- Immergere la pellicola di sangue perfettamente asciutta (estremità sottile rivolta VERSO IL BASSO) nella SOLUZIONE DI WRIGHT per circa 15 secondi.
NOTA Un bagno rapido di 5–10 secondi potrebbe ridurre la presenza di macchie d'acqua sulle pellicole che non sono perfettamente asciutte.
- Estrarre il vetrino dalla soluzione colorante e immergerlo nell'acqua deionizzata (estremità sottile rivolta VERSO IL BASSO) per circa 30 secondi. **NON SCUOTERE IL VETRINO MENTRE È IMMERSO NELL'ACQUA DEIONIZZATA.**
- Sciacquare brevemente in acqua deionizzata corrente e asciugare all'aria prima di procedere all'esame.

II. Metodo di colorazione orizzontale (manuale)

- Collocare la pellicola di sangue perfettamente asciutta su un rack per colorazione idoneo.
- Inondare il vetrino con 1–2 ml di COLORAZIONE DI WRIGHT.
- Trascorsi 30 secondi, senza lavare via il colorante del punto 2, aggiungere un pari volume di acqua deionizzata e mescolare bene soffiando dolcemente sul vetrino.
- Trascorso 1 minuto, sciacquare accuratamente con acqua deionizzata e asciugare all'aria.

Colorazione a lotti con il sistema Hemastainer

- Impostare i cronometri con i seguenti tempi per ogni stazione:
Stazione 1: 30 secondi
Stazione 2: 2 minuti
Stazione 3: 3,5 minuti
Stazione 4: 30 secondi
Stazione 5: Ignorare e procedere alla "asciugatura all'aria"

2. Preparare le stazioni per la colorazione nel seguente modo:
 Stazione 1: Metanolo assoluto, 500 ml
 Stazione 2: Colorazione di Wright ACCUSTAIN, 350 ml e Metanolo assoluto, 150 ml
 Stazione 3: Tampone fosfato, 500 ml, pH 7,2
 Stazione 4: Acqua deionizzata, 3,8 litri e Tampone fosfato, 100 ml
 Stazione 5: lasciare vuota
3. Portare la levetta POWER.
4. Portare la levetta AUTO-MANUAL su MANUAL.
5. Portare la levetta RIGHT-LEFT su LEFT.
6. Portare la levetta SWING su ON.
7. Portare la levetta PUMP su AUTO.
8. Caricare il cestino con pellicole di sangue perfettamente asciutte.
9. Appendere il cestino al sostegno e stringere.
10. Avviare la seduta portando la levetta AUTO-MANUAL su AUTO.
11. Quando il ciclo sarà terminato e i vetrini saranno perfettamente asciutti, portare la levetta AUTO-MANUAL su MANUAL. Il cestino tornerà alla posizione di partenza.

Colorazione a lotti con il sistema Fisher Stainmaster

Impostare il programma nel seguente modo:

| Evento | Stazione | Reagente | Tempo (minuti) |
|--------|-------------|--|----------------|
| 1 | 1 | Metanolo assoluto | 0,5 |
| 2 | 2 | Colorazione di Wright, modificata, n. di cat. WS-128 | 1,5 |
| 3 | 3 | Tampone fosfato, n. di cat. P 3288 | 1,0 |
| 4 | 6 | Acqua deionizzata | 0,3 |
| 5 | 5 | Soluzione di lavaggio 2, n. di cat. RS 2 | 0,7 |
| 6 | 4 | Acqua deionizzata | 0,3 |
| 7 | Asciugatura | Aria | 5,0 |

Colorazione a lotti con il sistema Midas II

Impostare il programma nel seguente modo:

| Passaggio | Bagno | Reagente | Tempo (secondi) |
|-----------|-------------|--|-------------------------------|
| 1 | 1 | Metanolo assoluto | 30 |
| 2 | 2 | Colorazione di Wright, modificata, n. di cat. WS-128 | 60-90 |
| 3 | 3 | Tampone fosfato, n. di cat. P 3288 | 60 |
| 4 | 4 | Acqua deionizzata corrente | 10 |
| 5 | Asciugatura | Aria | 3 minuti o finché asciutto |

I bagni non utilizzati possono essere omessi.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

I nuclei assumeranno svariate tonalità di viola. Il colore del citoplasma sarà di varie gradazioni, dal blu al rosa pallido. Nel citoplasma di alcuni tipi di cellule potrebbero comparire alcuni granuli dal rossiccio al lilla. I basofili saranno caratterizzati dalla presenza di granuli tra il blu scuro e il nero nel citoplasma. Gli eosinofili saranno caratterizzati dalla presenza di granuli di color arancione vivo nel citoplasma. I globuli rossi dovrebbero assumere un colore tra il rosa e l'arancione.



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

BIBLIOGRAFIA

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

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. WS
 Revisione precedente: 2003-09
 Revisione: 2010-06

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

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

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