

INDICATIONS

Le colorant de Wright est destiné à être utilisé pour la coloration des frottis de sang ou de moelle osseuse. Les solutions sont destinées à un « usage diagnostique in vitro ».

Le colorant de Wright est un colorant de Romanowsky modifié destiné à colorer de manière différentielle les divers éléments cellulaires composant le sang. Lorsque les frottis sanguins sont traités comme indiqué dans la présente notice, le noyau et le cytoplasme des globules blancs prennent une coloration bleue ou rose caractéristique. Les colorants purifiés des formulations ACCUSTAIN du colorant de Wright éliminent toute coloration non systématique et donnent des réponses chromogènes reproductibles d'un lot à l'autre.

Les procédures détaillées dans la présente notice décrivent l'utilisation du colorant de Wright comme colorant de trempage manuel ou à utiliser avec un automate de coloration de lots tels Hemastainer commercialisé par Geometric Data, Midas II d'EM Diagnostic Systems, Inc. et Fisher Stainmaster conçu par Fisher Scientific.

RÉACTIFS

COLORANT DE WRIGHT, MODIFIÉ, référence N° WS

Colorant de Wright, modifié, à 0,3 % p/v, tamponné à un pH de 6,8, dans du méthanol.

TAMPON PHOSPHATE, référence N° P3288

Un mélange de phosphate de sodium et de phosphate de potassium, à 0,0083 mol/l, pH 7,2.

SOLUTION DE RINÇAGE 2, référence N° RS2

Solution d'éthanol à 18 % et agent mouillant. Contient 0,02 % d'azide de sodium comme conservateur.

MÉTHANOL, SANS ACÉTONE, référence N° M 1775

CONSERVATION ET STABILITÉ :

Conserver les solutions de Wright à température ambiante (18–26 °C). L'étiquette du réactif porte une date de péremption.

Conserver le tampon phosphate, la solution de rinçage 2 et le méthanol à température ambiante (18–26 °C).

Conserver la solution de tampon phosphate à une température comprise entre 2 et 8 °C. Tiédir avant utilisation.

ALTÉRATION :

Éliminer les solutions du colorant de Wright en cas de formation d'un précipité. Éliminer la solution de tampon phosphate en cas de turbidité ou d'observation d'une prolifération bactérienne.

PRÉPARATION :

La solution du colorant de Wright est fournie prête à l'emploi, bien que le colorant de Wright puisse être dilué s'il est placé sur un automate. Consulter les instructions ci-dessous.

Le tampon phosphate (P3288) doit être préparé en diluant 1 flacon de tampon dans 3,8 litres d'eau déionisée. Bien mélanger pour dissoudre.

Le méthanol est prêt à l'emploi.

PRÉCAUTIONS :

Suivre les précautions habituelles observées lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets selon les règlements locaux, départementaux, régionaux ou nationaux en vigueur. Pour des informations actualisées sur les risques ou la sécurité, se reporter à la fiche technique du produit.

Informations sur les risques et la sécurité (États-Unis)

Le colorant de Wright est INFLAMMABLE et TOXIQUE. Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Irritant pour les yeux et la peau. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

La solution de rinçage 2 est COMBUSTIBLE et NOCIVE. Inflammable. Nocif par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter des gants appropriés. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre et former des composés très explosifs. Organes cibles : nerfs et foie.

Tampon phosphate. Attention : cette substance n'a pas encore été testée entièrement.

Le méthanol est INFLAMMABLE et TOXIQUE. Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Toxique : possibilité d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Irritant pour les yeux et la peau. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. Éviter l'accumulation de charges électrostatiques. Éviter le contact avec la peau. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Informations sur les risques et la sécurité (Europe) (Attention : ces substances n'ont pas encore été testées entièrement)

Le colorant de Wright et le méthanol sont FACILEMENT INFLAMMABLES et TOXIQUES. Facilement inflammable. Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Toxique : possibilité d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette). Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

La solution de rinçage 2 est IRRITANTE. Inflammable. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

Tampon phosphate. Attention : cette substance n'a pas encore été testée entièrement.

PROTOCOLE

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS :

Il est recommandé de prélever et de conserver les échantillons conformément au document M29-A2 du NCCLS. Aucune méthode d'analyse actuelle ne garantit totalement que les échantillons de sang ou de tissus ne transmettent pas d'agents infectieux. Par conséquent, tous les échantillons de sang ou de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Des frottis récents de sang total ou des frottis récents préparés à partir de sang anticoagulé avec de l'EDTA doivent être utilisés. Avant de préparer les frottis, bien mélanger le sang à température ambiante (18–26 °C). Les frottis doivent être préparés dans l'heure qui suit le prélèvement du sang. Si elles ne sont pas colorées le jour même, les lames doivent être fixées dans du méthanol absolu et conservées dans un récipient exempt de poussière.

MATÉRIELS SPÉCIFIQUES REQUIS MAIS NON FOURNIS :

Microscope
Lames
Lamelles de protection

REMARQUES :

1. Le temps de coloration peut être prolongé pour obtenir plus de détails sur les cellules. Il est possible de faire varier la couleur (colorations bleues ou rouges) en allongeant ou en réduisant le temps d'immersion dans l'eau déionisée.
2. Il est déconseillé d'effectuer une coloration rapide (15 secondes) pour la moelle osseuse. Pour obtenir de bons résultats, plonger ces préparations pendant 1 à 3 minutes dans le colorant et 2 à 6 minutes dans de l'eau déionisée.
3. Pour effectuer une coloration par lot, il est recommandé d'utiliser des supports de lames et de la vaisselle de type Miles Scientific pour Tissue-Tek® car ce système permet de placer les lames à la verticale.
4. Il est possible de faire varier la couleur en allongeant ou en réduisant le temps d'immersion dans l'eau déionisée. Les échantillons de moelle osseuse doivent être colorés pendant 90 secondes minimum et tamponnés pendant 90 secondes à 3 minutes.
5. Les temps de coloration indiqués dans les procédures décrites ci-dessus ont donné de bons résultats dans nos laboratoires. Ces temps peuvent être ajustés en fonction des préférences de chacun.
6. Les temps de la procédure manuelle peuvent également être appliqués lors de l'utilisation d'un automate Hemastainer à condition que la fonction « swing » soit désactivée (sur OFF).
7. Les temps peuvent varier en fonction des préférences de chacun. (Procédures automatisées)
8. Les rinçages à l'eau doivent s'effectuer avec de l'eau déionisée. (Procédures automatisées)
9. Si l'eau déionisée n'a pas un pH neutre, nous suggérons d'utiliser un tampon phosphate avec un pH de 7,2, référence N° P 3288.
10. Des lames de contrôle positif doivent être incluses dans chaque essai.
11. Les données obtenues par cette procédure permettent uniquement de faciliter le diagnostic et doivent être révisées conjointement à d'autres tests ou informations sur les diagnostics cliniques.

PROTOCOLE :

I. Méthode de trempage (rapide – manuelle)

1. Placer environ 50 ml de COLORANT DE WRIGHT dans une jarre de Coplin.
REMARQUE : LE CONSERVER DANS UN RÉCIPIENT FERMÉ HERMÉTIQUEMENT LORSQU'IL N'EST PAS UTILISÉ. Le remplacer lorsque des artéfacts d'eau apparaissent dans les globules rouges ou en cas d'observation d'un précipité.
2. Remplir une autre jarre de Coplin d'eau déionisée.
3. Placer le frottis sanguin complètement sec, le bord frangé vers le BAS, dans le COLORANT DE WRIGHT pendant environ 15 secondes.
REMARQUE : Un trempage rapide de 5 à 10 secondes peut réduire les artéfacts d'eau sur les frottis qui ne sont pas complètement secs.
4. Retirer les lames du colorant et les placer dans de l'eau déionisée, le bord frangé vers le BAS, pendant environ 30 secondes. NE PAS AGITER LA LAME PENDANT QU'ELLE SE TROUVE DANS L'EAU DÉIONISÉE.
5. Rincer rapidement sous de l'eau déionisée et laisser sécher complètement les lames à l'air libre avant de les examiner.

II. Méthode de coloration horizontale (manuelle)

1. Placer le frottis sanguin complètement sec sur un support pour coloration approprié.
2. Plonger la lame dans 1 à 2 ml de COLORANT DE WRIGHT.
3. Au bout de 30 secondes, sans rincer le colorant de Wright de l'étape 2, ajouter un volume égal d'eau déionisée et bien mélanger en soufflant doucement sur la lame.
4. Au bout d'1 minute, bien rincer à l'aide de l'eau déionisée et laisser sécher à l'air libre.

Coloration par lot avec l'automate Hemastainer

- Réglent les minuteries de façon à ce qu'elles indiquent les temps suivants pour chaque station :
Station 1 – 30 secondes
Station 2 – 2 minutes
Station 3 – 3,5 minutes
Station 4 – 30 secondes
Station 5 – Passer directement à « séchage à l'air libre »
- Préparer les stations pour la coloration comme suit :
Station 1 – Méthanol absolu, 500 ml
Station 2 – Colorant de Wright ACCUSTAIN, 350 ml et 150 ml de méthanol absolu
Station 3 – 500 ml de tampon phosphate, pH 7,2
Station 4 – 3,8 l d'eau déionisée et 100 ml de tampon phosphate
Station 5 – Laisser vide
- Mettez l'interrupteur d'alimentation en position ON.
- Mettre l'interrupteur Auto-Manual sur MANUAL.
- Mettre l'interrupteur Right/Left sur LEFT.
- Mettre l'interrupteur « swing » sur ON.
- Mettre l'interrupteur de la pompe sur AUTO.
- Placer les frottis complètement secs dans le panier.
- Attacher le panier au crochet et serrer.
- Démarrer le processus en plaçant l'interrupteur Auto-Manual sur AUTO.
- Lorsque le cycle est terminé et que les lames sont complètement sèches, mettre l'interrupteur Auto-Manual sur MANUAL. Le panier revient alors en position initiale.

Coloration par lot avec l'automate Fisher Stainmaster

Réglent le programme comme suit :

Étape	Station	Réactif	Temps (Minutes)
1	1	Méthanol absolu	0,5
2	2	Colorant de Wright, modifié, référence N° WS-128	1,5
3	3	Tampon phosphate, référence N° P 3288	1,0
4	6	Eau déionisée	0,3
5	5	Solution de rinçage 2, référence N° RS2	0,7
6	4	Eau déionisée	0,3
7	Séchage	Air	5,0

Coloration par lot avec l'automate Midas II

Réglent le programme comme suit :

Étape	Bain	Réactif	Temps (Secondes)
1	1	Méthanol absolu	30
2	2	Colorant de Wright, modifié, référence N° WS-128	60–90
3	3	Tampon phosphate, référence N° P3288	60
4	4	Eau déionisée courante	10
5	Séchage	Air	3 minutes ou jusqu'au séchage

Les bains non utilisés peuvent être omis.

PERFORMANCE

Les noyaux présentent diverses nuances de violet. La coloration cytoplasmique présente diverses colorations de bleu à rose clair. De fins granules rougeâtres à lilas peuvent être présents dans le cytoplasme de certains types de cellules. Le cytoplasme des basophiles présente des granules bleu foncé à noir. Le cytoplasme des éosinophiles présente des granules orange vif. Les globules rouges doivent être de couleur rose à orange.

Si les résultats observés sont différents des résultats escomptés, contacter le service technique Sigma-Aldrich pour obtenir de l'aide.

RÉFÉRENCES

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

Sigma-Aldrich, Inc. garantit la conformité de ses produits avec les informations contenues dans la présente notice et dans les autres notices Sigma-Aldrich. L'utilisateur doit s'assurer que le(s) produit(s) est/sont adapté(s) à l'utilisation qu'il souhaite en faire. D'autres conditions générales peuvent s'appliquer. Voir au verso de la facture ou du bordereau de commande les conditions générales de vente et autres informations.

Protocole N° WS
Révision précédente : 2003-03
Révision : 2003-09



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

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765
Service technique : en PCV au +1 314 771 3122
ou adresser un email à clintech@sial.com
Pour commander : en PCV au +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

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