

740-75**740-85****740-86****Microscopie****Colorant Selon Wright Harleco®**

Coloration polychrome pour les frottis de sang périphérique et de moelle osseuse



Dispositif médical de diagnostic in vitro

Utilisation prévue

Colorant Selon Wright Harleco® est utilisée pour le diagnostic cellulaire clinique et sert à l'examen des échantillons d'origine humaine.

Principe

Colorant Selon Wright utilise un colorant neutre de Romanowsky, formé de l'association de bleu de méthylène azuré comme composant basique et d'éosine comme composant acide. Romanowsky a modifié le colorant neutre mis au point auparavant par Ehrlich, qui permettait d'identifier les granules de leucocytes acidophiles, basophiles et neutrophiles. La coloration des noyaux est due à l'interaction moléculaire entre le colorant éosine Y et un complexe d'azur B avec l'ADN. Les deux colorants s'assemblent pour former un complexe éosine Y-azur B, et l'intensité de la coloration qui en résulte dépend de la teneur en azur B et du rapport entre l'azur B et l'éosine Y. En outre, la coloration qui en résulte peut varier selon la durée de fixation et de coloration, le pH des solutions ou la composition du tampon.

Échantillons

Frottis de sang total natif ou de moelle osseuse frais, matériel cytologique clinique tel qu'un sédiment d'urine, des expectorations, des frottis de biopsie d'aspiration à l'aiguille fine (BAAF), de lavages et d'empreintes.

Réactif

Réf. 740

Colorant Selon Wright Harleco® 1 l, 4 l, 10 l

Autre matériel requis :

Réf. 1217	Tampon phosphate, pH 6,4	1 l, 4 l
ou		
Réf. 1218	Tampon phosphate, pH 6,8	1 l, 4 l
ou		
Réf. 1219	Tampon phosphate, pH 7,0	1 l, 4 l
Réf. 6442	Eau désionisée/distillée,	
	ASTM Type II	4 l, 20 l
Réf. 65044A	Solution de coloration HemaColor®	
	(fixateur)	1 l, 4 l

Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés par un personnel qualifié. Tous les échantillons doivent être clairement marqués. Des instruments adaptés doivent être utilisés pour le prélèvement et la préparation des échantillons. Suivre le mode d'emploi / les instructions d'application du fabricant.

Préparation des réactifs

La solution est fournie sous forme de solution de coloration concentrée et doit être diluée avant utilisation avec un tampon, tel que décrit pour chaque application.

Procédure de coloration manuelle**Préparation du tampon de dilution**

- Placer 30 ml de tampon phosphate de pH 6,4, 6,8 ou 7,0 dans un récipient
- Ajouter 100 ml d'eau désionisée/distillée, ASTM Type II

Procédure : méthode lame recouverte

1. Placer les lames sur un portoir de coloration et recouvrir de méthanol (1 à 2 ml) pendant 1 minute. Laisser égoutter l'excès de méthanol.
2. Recouvrir les lames de 20 gouttes de colorant de Wright et laisser incubé pendant 1 minute. Ne pas rincer.
3. Ajouter 30 gouttes de tampon de dilution (voir la section Préparation du tampon de dilution). Mélanger en faisant doucement basculer la lame. Laisser reposer pendant 3 minutes. Un reflet métallique verdâtre devrait apparaître à la surface du mélange.
4. Laisser égoutter le mélange colorant-tampon et rincer la lame avec 5-10 ml d'eau désionisée pendant 10-15 secondes. Laisser sécher à l'air avant d'examiner.
5. Observer au microscope (voir la section Résultats).

Procédure : méthode lame immergée

Équipement requis : trois jarres de Coplin, pincettes

1. Placer la lame dans du méthanol (fixateur) pendant 30 secondes.
2. Placer la lame dans Colorant Selon Wright pendant 3 minutes.
3. Placer la lame dans le mélange colorant de Wright-tampon pendant 6 minutes. Le mélange colorant de Wright-tampon (stable pendant 3 heures) est préparé en combinant 20 ml de colorant de Wright et 100 ml de tampon de dilution (voir la section Préparation du tampon de dilution).
4. Retirer la lame du mélange colorant de Wright-tampon et rincer avec 10-15 ml d'eau désionisée.
5. Laisser sécher la lame.
6. Observer au microscope (voir la section Résultats).

Remarque : pour des résultats optimaux, les jarres de Coplin doivent être fermées quand elles ne sont pas utilisées.

Procédure de coloration à l'aide de l'automate de coloration de lames Midas® III-Plus

Préparation du colorant/tampon

- Placer 50 ml de colorant selon Wright dans un récipient.
- Ajouter 75 ml de tampon phosphate, pH 6,8.
- Ajouter 175 ml d'eau désionisée/distillée, ASTM Type II.
- Mélanger et laisser reposer 10 minutes avant utilisation.

Remarques :

- Pour une coloration plus basophile, utiliser un tampon phosphate de pH 6,8 ou 7,0.
- Il peut être nécessaire d'ajuster la durée d'incubation dans le colorant et/ou le mélange colorant/tampon si un tampon de pH différent est utilisé.
- Le débit d'eau de rinçage ne doit pas dépasser 2 000 ml/minute sur l'automate de coloration de lames Midas® III-Plus.
- Pour une coloration optimale, utiliser de l'eau DÉSIONISÉE ou DISTILLÉE.

Toutes les stations sont réglées par défaut sur la méthode par immersion. Il s'agit du protocole de coloration recommandé avec les colorations Harleco®.

Pour les frottis de sang périphérique

Solution	Station	Temps
Fixateur	2	30 secondes
Colorant Selon Wright	3	3 minutes
Mélange colorant/tampon	4	6 minutes
Rinçage	5	1,5 minute
Séchage	6	3 minutes

Pour les biopsies d'aspiration de moelle osseuse

Solution	Station	Temps
Fixateur	2	30 secondes
Colorant Selon Wright	3	10 minutes
Mélange colorant/tampon	4	20 minutes
Rinçage	5	1,5 minute
Séchage	6	3 minutes

Résultats

Types cellulaires	Noyau x	Granules	Cytoplasme
Érythrocytes		Rouge jaunâtre	Rouge jaunâtre
Leucocytes polymorpho-nucléaires neutrophiles	Bleu foncé à mauve	Lilas rougeâtre	Rose pâle
Leucocytes basophiles	Mauve ou bleu foncé	Mauve foncé à noir	
Leucocytes éosinophiles	Bleu à mauve	Rouge à rouge orangé	Bleu
Lymphocytes	Mauve foncé		Bleu ciel
Plaquettes		Violet à mauve	

Notes techniques pour les procédures de marquage manuelles

1. Il peut être nécessaire d'expérimenter et d'ajuster les durées d'incubation pour obtenir des résultats optimaux et une nette différenciation entre les cellules.
2. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque :
 - a. Les lames sont propres, sans corps gras ni débris.
 - b. Le méthanol (fixateur) ne contient pas d'acétone.
 - c. Les frottis sanguins sont fraîchement préparés.
 - d. Les frottis sanguins forment une couche très mince sur la lame.
3. L'intensité de la coloration peut être accrue en augmentant la durée des étapes 2 et 3. Cependant, cela n'aura qu'un effet modéré sur l'intensité.
4. Un tampon de pH 6,4 produit des résultats acidophiles. Les globules rouges seront roses (étape 3).

5. Un tampon de pH 6,8 produit des résultats neutrophiles. Les globules rouges seront de couleur rose jaunâtre à beige (étape 3).
6. L'eau distillée produit des résultats basophiles. Les globules rouges seront de couleur grise à bleu gris (étape 3).
7. Les meilleurs résultats pour la lecture des lames seront situés à l'extrémité la plus mince du frottis.

Diagnostic

Le diagnostic doit être effectué exclusivement par un personnel formé et agréé. Une nomenclature valide doit être utilisée.

Des tests complémentaires doivent être sélectionnés et réalisés selon des méthodes reconnues.

Des témoins adéquats doivent être effectués pour chaque application en vue d'éviter de rendre des résultats incorrects.

Stockage

+15-30 °C

Durée de conservation

Colorant selon Wright pour la microscopie peut être utilisée jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

À partir du moment où le flacon est ouvert pour la première fois, son contenu peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée s'il est conservé entre +15 et 30 °C.

Les flacons doivent toujours être fermés hermétiquement.

Instructions supplémentaires

À usage professionnel uniquement.

Pour éviter les erreurs, la procédure doit être réalisée par un personnel qualifié uniquement.

Les directives nationales de sécurité sur le lieu de travail et d'assurance qualité doivent être suivies.

Des microscopes équipés selon les normes en vigueur doivent être utilisés.

Protection contre les infections

Des mesures efficaces doivent être prises pour éviter les infections dans le cadre des directives de laboratoire.

Instructions d'élimination

L'emballage doit être éliminé selon les directives en vigueur. Les solutions usagées et celles qui ont dépassé la durée de conservation doivent être éliminées en tant que déchets spéciaux conformément aux directives locales.

Réactifs auxiliaires

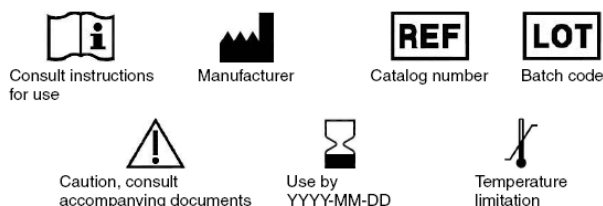
Réf. 64969	Milieu de montage Krystalon™ Harleco®	50 ml, 500 ml
Réf. 104699	Huile à immersion pour la microscopie	100 ml, 500 ml
Réf. 1217	Tampon phosphate, pH 6,4	1 l, 4 l
Réf. 1218	Tampon phosphate, pH 6,8	1 l, 4 l
Réf. 1219	Tampon phosphate, pH 7,0	1 l, 4 l
Réf. 6442	Eau désionisée/distillée, ASTM Type II	4 l, 20 l
Réf. 65044A	Solution de coloration HemaColor® (fixateur)	1 l, 4 l

Classification des risques

Réf. 740. Veuillez respecter la classification des risques imprimée sur l'étiquette et les informations contenues dans la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur le site Internet et sur demande.

Documentation

1. Routine Cytological Staining Techniques:



Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon and Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing Company

2. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W., and Kiernan, J.A.) Bios, 2002

Harleco® est une marque déposée de Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

HemaColor® est une marque déposée de Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Krystalon™ est une marque de Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Midas® est une marque de Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Statut au : 17/03/2021 20511118



EMD Millipore Corporation
400 Summit Drive
Burlington, MA 01821, USA
Tel. +1-978-715-4321