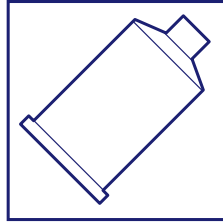
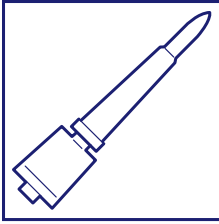


BD Unopette™ System Test



REF 365854
REF 365855

IVD

**Sistema
Système test
Systemtest
Test**

Pages

1-2	EN	English
3-4	ES	Español
5-6	FR	Français
7-8	DE	Deutsch
9-10	IT	Italiano

Symbols



EN Keep Away From Sunlight
ES No exponer a la luz solar
FR Protéger de la lumière solaire
DE Vor Sonnenlicht schützen
IT Non esporre alla luce solare



EN Manufacturer
ES Fabricante
FR Fabricant
DE Hersteller
IT Produttore



EN Authorized Representative
ES Representante autorizado
FR Représentant autorisé
DE Bevollmächtigter Vertreter
IT Rappresentante autorizzato



EN Fragile, Handle With Care
ES Frágil, manipular con precaución
FR Fragile, manipuler avec précautions
DE Zerbrechlich, mit Sorgfalt behandeln
IT Fragile, maneggiare con cura



EN This End Up
ES Este lado hacia arriba
FR Se terminez vers le haut
DE Diese Seite ist oben
IT Estremità superiore



LOT Batch Code



REF Catalog Number



Use By



Do Not Reuse



Consult Instructions For Use



Caution, Consult Accompanying Documents



Upper Limit of Temperature



In Vitro Diagnostic Medical Device

Product Information

Intended Use

BD Unopette™ System Test is a stable *in vitro* diagnostic reagent system for the enumeration of leukocytes and platelets in whole blood.

Summary

This method is based on the procedure developed by Brecher and Cronkite.¹ The ammonium oxalate diluent is modified by the addition of Sorensen's phosphate buffer to maintain the pH of the reagent, and thimerosal to act as an antibacterial agent.

Principle

Whole blood is added to the diluent, the tonicity of which lyses red cells but preserves platelets, leukocytes and reticulocytes. When erythrocytes are completely lysed, the solution will be clear red and counting can proceed. The diluted blood is placed in a hemacytometer according to accepted technique. Cells are allowed to settle for ten (10) minutes before leukocytes and platelets are counted.

Under 100X magnification using bright-light microscopy, leukocytes appear refractile. At this magnification some red cell stroma will be evident but will not interfere with the counting procedure.

Under 430X magnification using bright-light microscopy, platelets appear oval or round and frequently have one or more dendritic processes. Under the same magnification using phase microscopy, they appear morphologically the same as with bright-light microscopy but are uniformly opaque with a pink or purple sheen.

Leukocyte counts obtained with BD Unopette™ System Test compare favorably with those obtained using the Thoma White Cell Pipette with 3% acetic acid. Platelet counts obtained with BD Unopette™ System Test compare favorably with those obtained using the Thoma Red Cell Pipette with Rees-Ecker diluent. Platelet counts obtained with BD Unopette™ System Test also compare favorably with results obtained with the Coulter Counter®* Model F electric counting method.

BD Unopette™ System Test

1. BD Unopette™ reservoir containing 1.98 ml of 1% Buffered Ammonium Oxalate
2. BD Unopette™ capillary pipette 20 µl capacity

Warnings:

Moisture is added to BD Unopette™ reservoir jars to maintain shelf life. Thimerosal, a preservative added to both the jar and the reservoir reagent, may cause skin irritation. If reservoir is squeezed too hard, the specimen may be expelled through the top of the overflow chamber, resulting in contamination of the exposed skin. All specimen handling, diluting, and handling of the filled hemacytometer should be performed wearing personal protective equipment (i.e. gloves, lab coat, eye protection, etc).

Dilution Ratio

Sample to total volume 1:100

Reagent Stability

The reagent system is stable if stored below 30°C (86°F), protected from sunlight, and used before the expiration date under the stated conditions of the test. Do not use if reagent solution is not clear.

Equipment

1. Microscope equipped for 100X and 430X magnification. Phase contrast for platelet counts is optional.
2. Hemacytometer. Neubauer hemacytometer recommended.
3. Petri dish. Bottom should be lined with moist filter paper.

Specimen

Free-flowing capillary or thoroughly mixed anticoagulated venous blood. EDTA is the anticoagulant of choice. Use of an appropriate BD Vacutainer® Tube with EDTA is recommended for collection of venous specimens. (See Technical Notes 1 and 2). The diluted specimen is stable for three (3) hours at room temperature.

Interferences

Bacteria and other debris can interfere with platelet counts. However, bacteria, dirt and crystals can usually be properly identified by their refractility and lack of pink or purple sheen under phase microscopy. Care must be taken to differentiate platelets from extrinsic particles under bright-light microscopy.

Storage Instructions

If count cannot be performed immediately after blood is diluted, store reservoir at room temperature. Perform count within three (3) hours of making dilution.

*Coulter Counter® is a registered trademark of Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California.

Procedure

1. Puncture Diaphragm

Using the protective shield on the capillary pipette, puncture the diaphragm of the reservoir as follows:



- a. Place reservoir on a flat surface grasping reservoir in one hand, take pipette assembly in other hand and push tip of pipette shield firmly through diaphragm in neck of reservoir, then remove.



- b. Remove shield from pipette assembly with a twist.

2. Add Sample

Fill capillary with whole blood and transfer to reservoir as follows:



- a. Holding pipette almost horizontally, touch tip of pipette to blood. See adjacent diagrams. Pipette will fill by capillary action. Filling is complete and will stop automatically when blood reaches end of capillary bore in neck of pipette.



- b. Wipe excess blood from outside of capillary pipette, making certain that no sample is removed from capillary bore.



- d. Cover opening of overflow chamber of pipette with index finger and seat pipette securely in reservoir neck.



- c. Squeeze reservoir slightly to force out some air. Do not expel any liquid. Maintain pressure on reservoir.
- e. Release pressure on reservoir. Then remove finger from pipette opening. Negative pressure will draw blood into diluent.



- f. Squeeze reservoir gently two or three times to rinse capillary bore, forcing diluent up into, but not out of, overflow chamber, releasing pressure each time to return mixture to reservoir. See Caution Section.
- g. Place index finger over upper opening and gently invert several times to thoroughly mix blood with diluent.
- h. Let stand for ten (10) minutes to allow red cells to hemolyze. Leukocyte and platelet counts should then be performed within three (3) hours.

3. Charge Hemacytometer

Mix diluted blood thoroughly by inverting reservoir (see 2g above) to resuspend cells.



- a. Convert to dropper assembly by withdrawing pipette from reservoir and reseal securely in reverse



- b. To clean capillary bore, invert reservoir, gently squeeze sides and discard first three or four drops.

- c. Carefully charge hemacytometer with diluted blood by gently squeezing sides of reservoir to expel contents until chamber is properly filled.

- d. Place hemacytometer on moistened filter paper in Petri dish. Cover Petri dish and allow to stand ten (10) minutes to permit cells to settle. (Moistened filter paper retards evaporation of diluted specimen while standing.)

4. Count and Calculate

A leukocyte count is performed with a Neubauer hemacytometer as follows:



- a. Under 100X magnification, leukocytes are counted in all nine (9) large squares of the counting chamber.
- b. Add 10 percent of count to total number of cells counted. (See Technical Note 4)
- c. Multiply this figure by 100 to get total leukocyte count. Example: If 70 cells are counted, total count is: (70 + 7) X 100 = 7700 leukocytes/cu mm.

A platelet count is performed with a Neubauer hemacytometer as follows:



- a. Under 430X magnification using bright-light or phase microscopy, platelets are counted in all 25 small squares within the large center square.
- b. Multiply number of platelets counted by 1000 to get total platelet count.

Example: If 150 platelets are counted, total count is: 150 X 1000 = 150,000 platelets/cu mm.

Note: If another hemacytometer is used, calculations appropriate to the particular type should be employed.

Limitation of Procedure

A highly elevated leukocyte or platelet count may make accurate counting difficult. In either instance, a secondary dilution should be made. When calculating the total count, adjust the formulas to allow for secondary dilution.

Expected Performance

1. Comparison of platelet counts of 526 specimens of blood, performed in duplicate by Coulter Counter® Model F and BD Unopette™ System Test.

	Platelets per cu mm	
	BD Unopette™ System Test	Coulter Counter® Model F
Mean	244,900	207,700
Precision to one standard deviation by comparison of duplicates	± 15,400	± 15,700
Coefficient of variation	6.3%	7.6%

2. Precision of leukocyte counts and platelet counts using BD Unopette™ System Test.

Leukocyte Count

Determination (n)	40
Mean	5221 Leukocytes / cu mm
Standard deviation	± 382 Leukocytes / cu mm
Coefficient of variation	7.3%

Platelet Count

Determination (n)	18
Mean	303,000 Platelets / cu mm
Standard deviation	± 18,000 Platelets / cu mm
Coefficient of variation	5.9%

Technical Notes

1. Platelets become activated by surface contact and will aggregate. If samples are collected into evacuated tubes, tubes must be inverted 8-10 times immediately after filling. Delay in mixing may result in platelet clumping and erroneous results.
2. Excessive tissue trauma during collection of blood may also result in platelet clumping and reduce the accuracy of the platelet count. When clumps of platelets are observed in a hemacytometer, another sample of blood must be collected.
3. Cells and diluent must be adequately mixed and counting chambers should be properly filled if errors in manual counting procedures are to be avoided.
4. This step simplifies the calculation which actually entails dividing the number of cells by the number of squares counted and multiplying by 10 to correct for the depth of the chamber.

References

1. Brecher G, Cronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets, J Appl Physiol 3:365 (Dec) 1950.

Caution:

Handle all biologic samples and blood collection products according to the policies and procedures of your facility.

All glass has the potential for breakage; take precautionary measures during handling.

Obtain appropriate medical attention in the event of any exposure to biologic samples (e.g., through a puncture injury) since samples may transmit viral hepatitis, HIV (AIDS), or other infectious diseases.

Discard all products contaminated with blood in biohazard containers approved for their disposal.

Información del producto

Uso indicado

El Sistema BD Unopette™ es un sistema estable de reactivos diagnósticos *in vitro* para el recuento de leucocitos y plaquetas en sangre entera.

Resumen

Este método está basado en el procedimiento desarrollado por Brecher y Cronkite.¹ El diluyente de oxalato amónico ha sido modificado por adición del tampón de fosfato de Sorensen, para mantener el pH del reactivo, y de timerosal, que actúa como agente antibacteriano.

Principio

Se añade sangre entera al diluyente, cuya tonicidad lisa los eritrocitos pero conserva las plaquetas, los leucocitos y los reticulocitos. Cuando los eritrocitos están completamente lisados, la solución será roja transparente y se puede iniciar el recuento. La sangre diluida se coloca en el hemocitómetro siguiendo la técnica aceptada. Se dejan sedimentar las células durante diez (10) minutos antes de efectuar el recuento de leucocitos y plaquetas.

Los leucocitos se muestran refringentes bajo microscopía de luz intensa con un aumento de 100X. Con este aumento se observarán algunos estromas de eritrocitos, pero no interferirán con el procedimiento de recuento.

Bajo microscopía de luz intensa con un aumento de 430X las plaquetas se muestran ovales o redondas y con frecuencia tienen uno a más procesos dendríticos. Bajo el mismo aumento con microscopía de fase se muestran morfológicamente iguales que con microscopía de luz intensa, pero son uniformemente opacas con un lustre rosado o morado.

Los recuentos de leucocitos obtenidos con el Sistema BD Unopette™ se comparan favorablemente con los obtenidos mediante la Pipeta de leucocitos Thoma con ácido acético al 3%. Los recuentos de plaquetas obtenidos con el Sistema BD Unopette™ se comparan favorablemente con los obtenidos mediante la Pipeta de eritrocitos Thoma con diluyente de Rees-Ecker. Los recuentos de plaquetas obtenidos con el Sistema BD Unopette™ también se comparan favorablemente con los obtenidos mediante el método de recuento eléctrico Coulter Counter®* Modelo F.

Sistema BD Unopette™

1. Depósito BD Unopette™ que contiene 1,98 ml de oxalato amónico tamponado al 1%.
2. Pipeta capilar BD Unopette™ con 20 µl de capacidad.

Advertencias:

Se ha añadido humedad a los frascos de depósitos del BD Unopette™ para mantener la vida útil. El tiomersal, un conservante añadido tanto al frasco como al depósito de reactivo, puede provocar irritación cutánea. Si se aprieta el depósito con excesiva fuerza, la muestra puede ser expulsada por la parte superior de la cámara de desbordamiento, ocasionando la contaminación de la piel expuesta. Toda manipulación de muestras, su dilución y el manejo del hemocitómetro lleno deben realizarse con equipo de protección personal (esto es, guantes, bata de laboratorio, gafas protectoras, etc.).

Tasa de dilución

Muestra a volumen total 1:100

Estabilidad del reactivo

El sistema de reactivos es estable si se conserva por debajo de 30 °C (86 °F), se protege de la luz y se utiliza antes de la fecha de caducidad en las condiciones de prueba indicadas. No utilizar si la solución reactiva no es transparente.

Equipo

1. Microscopio equipado para un aumento de 100X y 430X. El contraste de fase para los recuentos de plaquetas es opcional.
2. Hemocitómetro. Se recomienda el hemocitómetro Neubauer.
3. Placa de Petri. El fondo debe revestirse de papel de filtro húmedo.

Muestra

Sangre venosa capilar de flujo libre o anticoagulada bien mezclada. El anticoagulante de elección es el EDTA. Se recomienda utilizar un tubo BD Vacutainer® con EDTA adecuado para la extracción de muestras venosas. (Véanse las notas técnicas 1 y 2). La muestra diluida es estable durante tres (3) horas a temperatura ambiente.

Interferencias

Las bacterias y otros restos pueden interferir con los recuentos de plaquetas. No obstante, las bacterias, la suciedad y los cristales pueden identificarse normalmente de forma correcta por su refringencia y por su falta de lustre rosado o morado bajo el microscopio de fase. Hay que procurar diferenciar las plaquetas de las partículas extrínsecas bajo el microscopio de luz intensa.

Instrucciones para el almacenamiento

Si no se puede llevar a cabo el recuento inmediatamente después de la dilución de la sangre, conservar el depósito a temperatura ambiente. Llevar a cabo el recuento en el plazo de tres (3) horas después de la dilución.

*Coulter Counter® es una marca registrada de Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California.

Procedimiento

1. Punción del diafragma

Utilizando la cubierta protectora de la pipeta capilar, punzar el diafragma del depósito del siguiente modo:



- a. Colocar el depósito en una superficie plana sujetándolo con una mano, tomar la pipeta con la otra y empujar la punta de la cubierta de la pipeta firmemente a través del diafragma del cuello del depósito, y después extraer.



- b. Separar la cubierta de la unidad de la pipeta con un giro.

2. Adición de la muestra

Llenar el capilar de sangre entera y transferirla al depósito del siguiente modo:



- a. Sosteniendo la pipeta casi horizontal, tocar la sangre con la punta de la pipeta. Véanse los diagramas adjuntos. La pipeta se llenará por acción capilar. El llenado estará completo y se interrumpirá automáticamente cuando la sangre llegue al final del orificio capilar en el cuello de la pipeta.



- b. Limpiar el exceso de sangre de la parte exterior de la pipeta capilar, procurando que no salga nada de muestra del orificio capilar.

- c. Apretar un poco el depósito para hacer salir algo de aire. No expulsar ningún líquido. Mantener la presión sobre el depósito.



- d. Cubrir la abertura de la cámara de desbordamiento de la pipeta con el dedo índice y asentar la pipeta firmemente en el cuello del depósito.

- e. Soltar la presión sobre el depósito. Después quitar el dedo de la abertura de la pipeta. La presión negativa arrastrará la sangre hacia el diluyente.



- f. Apretar con cuidado el depósito dos o tres veces para lavar el orificio capilar, empujando el diluyente hasta la cámara de desbordamiento, sin que se salga, soltando la presión cada vez para devolver la mezcla al depósito. Véase la sección de Precaución.



- g. Colocar el índice sobre la abertura superior e invertir suavemente varias veces para mezclar bien la sangre con el diluyente.

- h. Dejar reposar durante diez (10) minutos para permitir la hemólisis de los eritrocitos. Los recuentos de leucocitos y plaquetas deben llevarse a cabo después en el plazo de tres (3) horas.

3. Carga del hemocitómetro

Mezclar bien la sangre diluida invirtiendo el depósito (véase 2g más arriba) para resuspender las células.



- a. Convertir a unidad de cuentagotas retirando la pipeta del depósito y fijándola firmemente en posición inversa, como se indica.

- b. Para limpiar el orificio capilar, invertir el depósito, apretar suavemente los lados y desechar las tres o cuatro primeras gotas.



- c. Cargar con cuidado el hemocitómetro de sangre diluida apretando suavemente los lados del depósito para expulsar su contenido hasta llenar bien la cámara.

- d. Polocar el hemocitómetro sobre papel de filtro humedecido en una placa de Petri. Cubrir la placa de Petri y dejar reposar durante diez (10) minutos para que sedimenten las células. (El papel de filtro humedecido retarda la evaporación de la muestra diluida mientras reposa).

4. Recuento y cálculo

El recuento de leucocitos se lleva a cabo con un hemocitómetro Neubauer del siguiente modo:



- a. Bajo un aumento de 100X se cuentan los leucocitos en los nueve (9) cuadrados grandes de la cámara de recuento.

- b. Se añade un 10 por ciento del recuento al número total de células contadas. (Véase la nota técnica 4).

- c. Se multiplica esta cifra por 100 para obtener el recuento total de leucocitos. Ejemplo: si se cuentan 70 células, el recuento total es: (70 + 7) X 100 = 7.700 leucocitos/mm³.

El recuento de plaquetas se lleva a cabo con un hemocitómetro Neubauer del siguiente modo:



- Bajo un aumento de 430X con microscopía de luz intensa o de fase, se cuentan las plaquetas en los 25 cuadrados pequeños que hay dentro del cuadrado central grande.
- Se multiplica el número de plaquetas contadas por 1000 para obtener el recuento total de plaquetas.

Ejemplo: si se cuentan 150 plaquetas, el recuento total es: $150 \times 1.000 = 150.000$ plaquetas/mm³.

Nota: si se utiliza otro hemocitómetro, hay que utilizar los cálculos adecuados para ese tipo concreto.

Limitaciones del procedimiento

Un número muy elevado de leucocitos o plaquetas puede dificultar el recuento preciso. En ambos casos hay que efectuar una dilución secundaria. Para calcular el recuento total hay que ajustar las fórmulas para compensar la dilución secundaria.

Rendimiento esperado

- Comparación de los recuentos de plaquetas de 526 muestras de sangre realizados por duplicado con el Coulter Counter® Modelo F y el Sistema BD Unopette™.

	Plaquetas por mm ³	
	Sistema BD Unopette™	Coulter Counter® Modelo F
Media	244.900	207.700
Precisión hasta una desviación típica por comparación de duplicados	± 15.400	± 15.700
Coefficiente de variación	6,3%	7,6%

- Precisión de los recuentos de leucocitos y plaquetas con el Sistema BD Unopette™.

Recuento de leucocitos

Determinación (n)	40
Media	5.221 leucocitos / mm ³
Desviación típica	± 382 leucocitos / mm ³
Coefficiente de variación	7,3%

Recuento de plaquetas

Determinación (n)	18
Media	303.000 plaquetas / mm ³
Desviación típica	± 18.000 plaquetas / mm ³
Coefficiente de variación	5,9%

Notas técnicas

- Las plaquetas se activan por contacto superficial y se agregan. Si se extraen las muestras en tubos de vacío, hay que invertir los tubos 8-10 veces inmediatamente después de su llenado. El retraso en la mezcla puede dar lugar a la agregación de las plaquetas y a unos resultados erróneos.
- Un traumatismo excesivo de los tejidos durante la extracción de sangre puede dar lugar también a la agregación de las plaquetas y reducir la precisión del recuento de plaquetas. Cuando se observen agregados de plaquetas en el hemocitómetro hay que extraer otra muestra de sangre.
- Hay que mezclar bien las células y el diluyente y hay que llenar debidamente las cámaras de recuento para evitar errores en los procedimientos de recuento manual.
- Este paso simplifica el cálculo, que en realidad consiste en dividir el número de células por el número de cuadrados contados y multiplicar por 10 para corregir la profundidad de la cámara.

Referencias

- Brecher G, Cronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets, J Appl Physiol 3:365 (Dec) 1950.

Precaución:

Manipule todas las muestras biológicas y los productos de extracción de sangre de acuerdo con las normas y procedimientos seguidos en su centro.

Todos los objetos de vidrio pueden romperse; adopte medidas de precaución durante su manipulación.

Obtenga la atención médica adecuada en el caso de que quede expuesto a alguna muestra biológica (por ejemplo tras un pinchazo), ya que las muestras pueden transmitir la hepatitis vírica, la infección por el VIH (SIDA) u otras enfermedades infecciosas.

Deseche todos los productos contaminados con sangre en recipientes para materiales de riesgo biológico que hayan sido aprobados para su eliminación.

Informations produit

Usage prévu

Le système test BD Unopette™ est un système de réactif de diagnostic *in vitro* stable pour la numération des leucocytes et plaquettes en sang total.

Sommaire

Cette méthode utilise la procédure développée par Brecher et Cronkite.¹ Le diluant à l'oxalate d'ammonium est modifié par l'addition d'un tampon phosphate de Sorensen pour maintenir le pH du réactif et de thimérosal, en tant qu'agent antibactérien.

Principe

Le sang total est ajouté au diluant, dont la tonicité lyse les cellules rouges, mais préserve les plaquettes, leucocytes et réticulocytes. Une fois les érythrocytes complètement lysés, la solution est rouge limpide, et la numération peut être effectuée. Le sang dilué est chargé dans un hémacytomètre selon la technique agréée. Les cellules sont laissées à sédimenter pendant dix (10) minutes avant que les leucocytes et plaquettes soient comptés.

Sous un agrandissement de 100 x par microscopie en lumière directe, les leucocytes apparaissent réfractiles. À ce grossissement un certain stroma de cellules rouges apparaît mais n'affecte pas la procédure de numération.

Sous un agrandissement de 430 x par microscopie sous lumière vive, les plaquettes apparaissent ovales ou rondes et présentent fréquemment une ou plusieurs excroissances dendritiques. En utilisant le même grossissement et la microscopie en contraste de phase, elles présentent la même morphologie qu'avec la microscopie en lumière directe, mais sont uniformément opaques avec un reflet rose ou mauve.

Les numérations de leucocytes obtenues avec le système test BD Unopette™ sont favorablement comparées avec celles obtenues au moyen de la pipette Thoma White Cell, avec un diluant contenant 3 % d'acide acétique. Les numérations de plaquettes obtenues avec le système test BD Unopette™ sont également favorablement comparées à celles obtenues au moyen de la pipette Thoma Red Cell, avec un diluant Rees-Ecker. Les numérations de plaquettes obtenues avec le système test BD Unopette™ sont également favorablement comparées à celles obtenues avec le système électrique Coulter Counter®* Model F.

BD Unopette™ Système test

- Réservoir BD Unopette™ contenant 1,98 ml d'oxalate d'ammonium tamponné à 1 %
- Pipette capillaire BD Unopette™ de 20 µl

Avertissements:

Bocal BD Unopette™ humidifié pour maintenir la durée de vie. Le thimérosal, un agent de conservation ajouté au réactif du bocal et du réservoir, peut causer une irritation cutanée. Si le réservoir est comprimé trop fortement, l'échantillon peut s'échapper par le haut de la chambre de trop-plein et être en contact avec les doigts. La manipulation des échantillons et de l'hémacytomètre rempli, ainsi que la dilution, doivent être effectués avec (c'est-à-dire un équipement de protection, blouse, lunettes de protection, etc).

Taux de dilution

Echantillon à volume total 1:100

Stabilité du réactif

Le système de réactif est stable lorsqu'il est conservé au-dessous de 30 °C (86 °F), à l'abri du soleil et utilisé avant la date de péremption, dans les conditions indiquées pour le test. Ne pas utiliser la solution de réactif si elle n'est pas limpide.

Matériel

- Microscopie équipé pour un grossissement de 100 x et 430 x. Le contraste de phase pour la numération de plaquettes est facultatif.
- Hémacytomètre (Neubauer recommandé).
- Boîte de Pétri. Le fond doit être garni de papier filtrant humidifié.

Échantillon

Sang capillaire fluide ou sang veineux anticoagulé soigneusement mélangé. L'EDTA est l'anticoagulant recommandé. L'usage d'un tube BD Vacutainer® avec EDTA approprié est recommandé pour le prélèvement des échantillons veineux. (Voir les notes techniques 1 et 2). L'échantillon dilué reste stable pendant trois (3) heures à température ambiante.

Interférences

Les bactéries et autres débris peuvent affecter la numération des plaquettes. Toutefois, les bactéries, poussières et cristaux peuvent généralement être correctement identifiés par leur réfractivité et l'absence de reflet rose ou mauve sous microscope en contraste de phase. Avec la microscopie en lumière directe, il convient de veiller à différencier les plaquettes des particules extrinsèques.

Conservation

Si la numération ne peut pas être effectuée immédiatement après la dilution du sang, conserver le réservoir à température ambiante. Effectuer la numération dans les trois (3) heures suivant la dilution.

*Coulter Counter® est une marque déposée de Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Californie

Procédure

1. Perforation du diaphragme

À l'aide du manchon protecteur de la pipette, perforer le diaphragme du réservoir, comme suit :



- Placer le réservoir sur une surface plane et, en le tenant d'une main et la pipette de l'autre, enfoncer fermement la pipette dans le diaphragme du col du réservoir, puis la retirer.



- Retirer le manchon du protecteur de la pipette avec un mouvement rotatif.

2. Ajout de l'échantillon

Remplir le capillaire de sang total et le charger dans le réservoir, comme suit :



- Tout en tenant la pipette presque à l'horizontale, mettre sa pointe en contact avec le sang. Voir les schémas ci-contre, la pipette se remplit par capillarité. Le remplissage est terminé et cesse automatiquement lorsque le sang atteint l'extrémité du capillaire, dans le col de la pipette.



- Essuyer l'excédent de sang de l'extérieur de la pipette en veillant à ne pas enlever de sang du capillaire.



- Pincer légèrement le réservoir pour chasser un peu d'air. Veiller à ne pas expulser de liquide. Maintenir la pression sur le réservoir.



- Couvrir l'ouverture de la chambre de trop-plein de la pipette avec l'index et engager fermement la pipette dans le col du réservoir.



- Cesser d'appuyer sur le réservoir. Ensuite, retirer le doigt de l'ouverture de la pipette. La pression négative aspire le sang dans le diluant.



- Presser doucement le réservoir deux ou trois fois pour rincer le capillaire en forçant le diluant dans la chambre de trop-plein, en veillant à ne pas faire déborder, et relâcher la pression sur le réservoir à chaque fois pour faire retourner le mélange dans le réservoir. Voir la section **Précautions**.



- Boucher le haut de la chambre de trop-plein avec l'index et inverser délicatement plusieurs fois, pour bien mélanger le sang au diluant.



- Laisser reposer pendant dix (10) minutes pour permettre aux cellules rouges de s'hémolyser. La numération des leucocytes et des plaquettes doit être réalisée dans les trois (3) heures.

3. Chargement de l'hémacytomètre

Mélanger soigneusement le sang dilué (voir 2g ci-dessus) pour remettre les cellules en suspension.



- Convertir la pipette en compte-gouttes en la retirant du réservoir et en la réinsérant solidement dans le sens opposé, comme illustré



- Pour nettoyer le capillaire, inverser le réservoir, le pincer délicatement pour chasser trois ou quatre gouttes

- En procédant avec précaution, charger l'hémacytomètre de sang dilué en appuyant délicatement sur le réservoir pour expulser son contenu, jusqu'à ce que la chambre soit complètement remplie.

- Placer l'hémacytomètre sur le papier filtrant humidifié de la boîte de Pétri. Couvrir la boîte de Pétri et la laisser au repos pendant dix (10) minutes pour permettre la sédimentation des cellules. (Le papier filtrant humidifié retarde l'évaporation de l'échantillon dilué.)

4. Numération et calcul

Effectuer la numération des leucocytes au moyen d'un hémacytomètre Neubauer, comme suit :



- Sous un grossissement de 100 x, les leucocytes sont comptés dans chacun des neuf (9) grands carrés de la chambre de numération.

- Ajouter 10 pour cent au nombre total de cellules. (Voir la note technique 4.)

- Multiplier ce résultat par cent pour obtenir le nombre de leucocytes. Par exemple : pour 70 cellules, le compte total sera : $(70 + 7) \times 100 = 7700$ leucocytes/mm³.

Effectuer la numération des plaquettes au moyen d'un hémacytomètre Neubauer, comme suit :



- Sous un grossissement de 430 x, en lumière directe ou en contraste de phase, les plaquettes sont comptées dans chacun des vingt-cinq (25) petits carrés inclus dans le grand carré central.
- Multiplier le résultat par 1 000 pour obtenir le nombre total de plaquettes.

Par exemple : pour 150 plaquettes, le compte total sera : $150 \times 1000 = 150\,000$ plaquettes/mm³.

Remarque : Si un autre hémacytomètre est utilisé, la méthode de calcul correspondant à cet appareil doit être employée.

Limites de la procédure

Un compte de leucocytes ou de plaquettes extrêmement élevé peut rendre la précision de la numération difficile. Dans les deux cas, une seconde dilution doit être effectuée. Lors du calcul du compte total, ajuster la formule en fonction de la seconde dilution.

Résultats escomptés

- Comparaison des résultats de numération des plaquettes pour 526 échantillons de sang, obtenus avec les tests Coulter Counter® Model F et le système test BD Unopette™.

	Plaquettes par mm ³	
	BD Unopette™ Système test	Coulter Counter® Model F
Moyenne	244 900	207 700
Précision pour un écart-type par comparaison des deux tests	± 15 400	± 15 700
Coefficient de variation	6,3%	7,6%

- Précision des comptes de leucocytes et de plaquettes au moyen du système test BD Unopette™.

Détermination du

Compte de leucocytes (n)	40
Moyenne	5 221 Leucocytes / mm ³
Écart-type	± 382 Leucocytes / mm ³
Coefficient de variation	7,3%

Détermination du

Compte de plaquettes (n)	18
Moyenne	303 000 plaquettes / mm ³
Écart-type	± 18 000 plaquettes / mm ³
Coefficient de variation	5,9%

Notes techniques

- Les plaquettes sont activées par le contact de surface et s'agglutinent. Si les échantillons sont prélevés dans des tubes sous vide, ces derniers doivent être inversés 8 à 10 fois immédiatement après le remplissage. Un délai dans l'homogénéisation peut causer une agglutination des plaquettes et des résultats erronés.
- Un traumatisme tissulaire excessif au cours du prélèvement sanguin peut également causer l'agglutination des plaquettes et réduire la précision de la numération. Lorsque des agglutinations de plaquettes sont observées dans un hémacytomètre, un nouvel échantillon de sang doit être utilisé.
- Pour éviter des erreurs de compte manuel, les cellules et le diluant doivent être correctement mélangés et les chambres de numération correctement remplies.
- Cette étape simplifie les calculs qui impliquent la division du nombre de cellules par le nombre de carrés de numération et multiplication par 10 afin de compenser la profondeur de la chambre.

Références

- Brecher G, Cronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets, J Appl Physiol 3:365 (Dec) 1950.

Mise en garde :

Manipuler tous les échantillons biologiques et les dispositifs de prélèvement sanguin conformément aux réglementations et procédures en vigueur dans l'établissement.

Manipuler les objets en verre avec précaution (risque de bris).

En cas d'accident d'exposition à un échantillon biologique (par exemple, à la suite d'une piqûre avec une aiguille), consulter un médecin, car cet échantillon peut transmettre les virus d'hépatites, le VIH (SIDA) et autres maladies infectieuses.

Éliminer tous les produits contaminés par du sang dans des collecteurs agréés pour matières biologiques.

Produktinformation

Verwendungszweck

Der BD Unopette™-Systemtest ist ein stabiles Reagenzsystem für die *In-vitro*-Diagnostik zur Auszählung von Leukozyten und Thrombozyten in Vollblut.

Zusammenfassung

Diese Methode beruht auf dem von Brecher und Cronkite entwickelten Verfahren.¹ Die Ammoniumoxalat-Verdünnungslösung wird durch Zugabe von Sörensen-Phosphatpuffer zur Erhaltung des pH-Werts des Reagenzes und Thimerosal als antibakterieller Substanz modifiziert.

Prinzip

Vollblut wird zur Verdünnungslösung gegeben, deren Tonizität die roten Zellen lysiert, während Thrombozyten, Leukozyten und Retikulozyten intakt bleiben. Nach vollständiger Lyse aller Erythrozyten ist die Lösung klar rot, und die Auszählung kann vorgenommen werden. Das verdünnte Blut wird gemäß der allgemein anerkannten Methode in ein Hämozytometer eingebracht. Nachdem sich die Zellen zehn (10) Minuten lang abgesetzt haben, werden die Leukozyten und Thrombozyten ausgezählt.

Unter einem Mikroskop mit hellem Licht und einer 100X-Vergrößerung erscheinen Leukozyten refraktil. Bei dieser Vergrößerung ist das Stroma der Erythrozyten zum Teil sichtbar. Das Auszählverfahren wird dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

Bei 430X-Vergrößerung und unter einem Mikroskop mit hellem Licht erscheinen Thrombozyten oval oder rund und besitzen häufig ein oder mehrere Dentriten. Wird bei dieser Vergrößerung Phasenmikroskopie benutzt, erscheinen sie morphologisch genauso wie bei der Mikroskopie unter hellem Licht, sind jedoch einheitlich opak mit rosafarbenem oder dunkelviolettem Glanz.

Mit dem BD Unopette™-Systemtest vorgenommene Leukozytenauszählungen liefern im Vergleich zum Verfahren mit der Thoma-White-Cell-Pipette mit 3 % Essigsäure vorteilhafte Ergebnisse. Mit dem BD Unopette™-Systemtest vorgenommene Thrombozytenauszählungen liefern im Vergleich zum Verfahren mit der Thoma-Red-Cell-Pipette mit Rees-Ecker-Verdünnungslösung vorteilhafte Ergebnisse. Mit dem BD Unopette™-Systemtest vorgenommene Thrombozytenauszählungen liefern im Vergleich zur elektronischen Auszählung mit Coulter Counter®* Modell F vorteilhafte Ergebnisse.

BD Unopette™-Systemtest

1. BD Unopette™-Behälter mit 1,98 ml gepufferter 1 % Ammoniumoxalatlösung
2. BD Unopette™-Kapillarpipette, 20 µl

Warnhinweise:

Den BD Unopette™-Behältern wird zur Erhaltung der Lagerungsdauer Feuchtigkeit zugesetzt. Thimerosal, ein Konservierungsmittel, das sowohl dem Gefäß wie auch dem Reagenzbehälter zugegeben wird, kann hautreizend sein. Bei zu starkem Zusammendrücken des Behälters kann die Probe oben aus der Überlaufkammer austreten und in Kontakt mit der exponierten Haut kommen. Bei der Handhabung und Verdünnung von Proben sowie der Handhabung des gefüllten Hämozytometers ist grundsätzlich eine Schutzausrüstung (z.B. Handschuhe, Laborkittel, Augenschutz usw.) zu verwenden.

Verdünnungsverhältnis

Probe zum Gesamtvolumen 1:100

Reagenzienstabilität

Das Reagenzsystem ist stabil, wenn es unterhalb von 30 °C (86 °F) sonengeschützt aufbewahrt wird und vor dem Verfallsdatum unter den angegebenen Testbedingungen verwendet wird. Nicht verwenden, wenn die Reagenzlösung nicht klar ist.

Geräte und Zubehör

1. Mikroskop zur 100X- und 430X-Vergrößerung Ein Phasenkontrast für Thrombozytenauszählungen ist optional.
2. Hämozytometer. Es wird ein Neubauer-Hämozytometer empfohlen.
3. Petrischale. Der Boden muss mit feuchtem Filterpapier ausgekleidet sein.

Proben

Frei fließendes Kapillarblut oder vollständig gemischtes antikoagulierte venöses Blut. Das Antikoagulanzen der Wahl ist EDTA. Für die Entnahme venöser Blutproben wird die Verwendung eines geeigneten BD Vacutainer®-Röhrchens mit EDTA empfohlen. (Siehe technische Anmerkungen 1 und 2). Die verdünnte Probe ist bei Raumtemperatur drei (3) Stunden lang stabil.

Störungen

Bakterien und andere Ablagerungen können mit Thrombozytenzählungen interferieren. Bakterien, Schmutzpartikel und Kristalle können jedoch in der Regel durch ihre bei der Phasenmikroskopie erkennbare Refraktilität und das Fehlen eines rosafarbenen oder dunkelvioletten Glanzes identifiziert werden. Bei der Mikroskopie mit hellem Licht muss eine sorgfältige Differenzierung von Thrombozyten und extrinsischen Partikeln erfolgen.

*Coulter Counter® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California

Lagerungsanweisungen

Kann die Auszählung nicht unmittelbar nach der Verdünnung des Bluts erfolgen, ist der Behälter bei Raumtemperatur aufzubewahren. Die Auszählung ist innerhalb von drei (3) Stunden nach der Herstellung der Verdünnung vorzunehmen.

Verfahren

1. Durchstechen des Diaphragmas

Das Diaphragma des Behälters mit Hilfe der Schutzkappe der Kapillarpipette wie folgt durchstechen:



- a. Den Behälter auf eine flache Unterlage stellen und mit einer Hand festhalten. Die Pipette in die andere Hand nehmen und die Pipettenspitze fest durch das Diaphragma im Behälterhals drücken und dann herausnehmen.



- b. Die Kappe durch Abdrehen von der Pipette entfernen.

2. Probe zugeben

Kapillare mit Vollblut füllen und wie folgt in den Behälter überführen:



- a. Pipette nahezu horizontal halten und mit der Pipettenspitze das Blut berühren. Siehe nebenstehende Diagramme. Die Pipette füllt sich durch die Kapillarwirkung. Die Füllung ist vollständig und stoppt automatisch, wenn das Blut das Ende der Kapillarröhre im Pipettenhals erreicht.



- b. Überschüssiges Blut vom Äußeren der Kapillarpipette abwischen. Dabei darf keine Probe aus der Kapillarröhre entfernt werden.



- c. Durch leichtes Zusammendrücken des Behälters etwas Luft herauspressen. Keine Flüssigkeit austreten lassen. Den Druck auf den Behälter aufrecht erhalten.



- d. Die Öffnung der Überflussskammer der Pipette mit dem Zeigefinger abdecken und die Pipette sicher in den Behälterhals einsetzen.



- e. Den Druck auf den Behälter ablassen. Anschließend den Finger von der Pipettenöffnung nehmen. Durch den negativen Druck wird Blut in die Verdünnungslösung gesaugt.



- f. Den Behälter vorsichtig zwei- oder dreimal zusammen drücken, um die Kapillarröhre auszuspülen. Dabei wird die Verdünnungslösung in die Überlaufkammer hinein, aber nicht aus dieser heraus befördert. Dabei wird die Mischung durch den nachlassenden Druck jedes Mal zurück in den Behälter befördert. Siehe Abschnitt Vorsicht.



- g. Die obere Öffnung mit dem Zeigefinger verschließen und vorsichtig mehrmals umschwenken, um das Blut gründlich mit der Verdünnungslösung zu mischen.



- h. Zehn (10) Minuten stehen lassen, so dass die Erythrozyten hämolysieren können. Leukozyten und Thrombozyten müssen danach innerhalb von drei (3) Stunden ausgezählt werden.

3. Beladen des Hämozytometers

Das verdünnte Blut durch Umschwenken des Behälters (siehe 2g oben) zur Resuspension der Zellen gründlich mischen.



- a. Die Umwandlung in die Tropfenrichtung wird vorgenommen, indem die Pipette vom Behälter abgezogen und in umgekehrter Position erneut sicher eingesetzt wird.



- b. Zur Reinigung der Kapillarröhre den Behälter umdrehen, die Seiten vorsichtig zusammendrücken und die ersten drei oder vier Tropfen verwerfen.



- c. Das Hämozytometer vorsichtig mit verdünntem Blut beladen, indem die Seiten des Behälters vorsichtig zusammengedrückt werden, bis der austretende Inhalt die Kammer ausreichend gefüllt hat.

- d. Das Hämozytometer auf ein befeuchtetes Filterpapier in einer Petrischale setzen. Die Petrischale abdecken und zehn (10) Minuten stehen lassen, damit sich die Zellen absetzen können. (Feuchtes Filterpapier verhindert die Evaporierung verdünnter Proben während des Stehens.)

4. Auszählung und Berechnung

Die Leukozytenzählung wird wie folgt mit dem Neubauer-Hämozytometer durchgeführt:



- Die Leukozyten werden bei 100X-Vergrößerung in allen neun (9) großen Quadraten der Auszählkammer gezählt.
- Zur Gesamtzahl gezählter Zellen 10 % addieren. (siehe technische Anmerkung 4)
- Die Multiplikation dieser Zahl mit 100 ergibt die Gesamtleukozytenzahl. Beispiel: Wenn 70 Zellen gezählt werden, errechnet sich die Gesamtzellzahl wie folgt: $(70 + 7) \times 100 = 7700$ Leukozyten/mm³.

Die Thrombozytenzählung wird wie folgt mit dem Neubauer-Hämozytometer durchgeführt:



- Bei 430X-Vergrößerung werden Thrombozyten mit Hilfe von Mikroskopie mit hellem Licht oder Phasenmikroskopie in allen 25 kleinen Quadraten innerhalb des großen Mittelquadrates gezählt.
- Durch Multiplikation der Zahl der gezählten Thrombozyten mit 1000 erhält man die Gesamtthrombozytenzahl.

Beispiel: Wenn 150 Thrombozyten gezählt werden, errechnet sich die Gesamtzahl wie folgt: $150 \times 1000 = 150\,000$ Thrombozyten/mm³.

Anmerkung: Bei Verwendung eines anderen Hämatozytometers müssen für dieses Modell spezifische Berechnungen angewandt werden.

Einschränkungen des Verfahrens

Ein stark erhöhter Leukozyten- oder Thrombozytenspiegel kann die Genauigkeit der Auszählung erschweren. In beiden Fällen ist eine sekundäre Verdünnung herzustellen. Bei der Berechnung der Gesamtzahl muss eine Korrektur der Formeln unter Berücksichtigung der sekundären Verdünnung erfolgen.

Erwartete Leistung

- Vergleich der Thrombozytenzahlen aus 526 Blutproben, die sowohl mit dem Coulter Counter®-Modell F als auch dem BD Unopette™ Systemtest ermittelt wurden.

	Thrombozyten pro mm ³	
	BD Unopette™ -Systemtest	Coulter Counter® -Modell F
Mittelwert	244 900	207 700
Präzision anhand einer Standardabweichung nach Vergleich von Duplikaten	± 15 400	± 15 700
Variationskoeffizient	6,3 %	7,6 %

- Präzision der Leukozyten und Thrombozytenzählungen bei Verwendung des BD Unopette™-Systemtests.

Leukozytenanzahl

Bestimmung (n)	40
Mittelwert	5 221 Leukozyten / mm ³
Standardabweichung	± 382 Leukozyten / mm ³
Variationskoeffizient	7,3%

Thrombozytenanzahl

Bestimmung (n)	18
Mittelwert	303 000 Thrombozyten / mm ³
Standardabweichung	± 18 000 Thrombozyten / mm ³
Variationskoeffizient	5,9%

Technische Anmerkungen

- Thrombozyten werden durch Oberflächenkontakt aktiviert und aggregieren. Werden zur Probenentnahme evakuierte Röhrchen verwendet, müssen die Röhrchen unmittelbar nach dem Befüllen 8-10 mal umgeschwenkt werden. Wird diese Mischung erst später vorgenommen, können die Thrombozyten verklumpen und zu fehlerhafte Ergebnisse erhalten werden.
- Exzessives Gewebetrauma während der Blutentnahme kann ebenfalls zur Verklumpung der Thrombozyten führen und die Genauigkeit der Thrombozytenzählung reduzieren. Werden in einem Hämozytometer verklumpte Thrombozyten wahrgenommen, muss eine neue Blutprobe entnommen werden.
- Zellen und Verdünnungsmittel müssen ausreichend vermischt und Zählkammern ausreichend gefüllt werden, damit bei manuellen Auszählverfahren keine Fehler auftreten.
- Dieser Schritt vereinfacht die Berechnung, bei der die Anzahl der Zellen durch die Anzahl der gezählten Quadrate dividiert und dann mit 10 multipliziert wird, um der Tiefe der Kammer Rechnung zu tragen.

Literatur

- Brecher G, Cronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets, J Appl Physiol 3:365 (Dec) 1950.

Vorsicht :

Alle biologischen Proben und Blutentnahmeprodukte müssen entsprechend den für Ihre jeweilige Institution geltenden Bestimmungen und Verfahren gehandhabt werden.

Glas ist grundsätzlich zerbrechlich; daher müssen beim Umgang mit Glas stets Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

Bei jeglichem Kontakt mit biologischen Proben (z.B. durch eine Stichverletzung) ist kompetenter ärztlicher Rat einzuholen, da solche Proben Virushepatitis, HIV (AIDS) oder andere Infektionskrankheiten übertragen können.

Alle mit Blut kontaminierten Produkte in für deren Entsorgung zugelassene Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgen.

Informazioni sul prodotto

Destinazione d'uso

Il test BD Unopette™ è un sistema reagente diagnostico stabile *in vitro* impiegato per il conteggio di leucociti e di piastrine nel sangue intero.

Sommario

Questa metodica si basa sulla procedura elaborata da Brecher e Cronkite.¹ Il diluente di ossalato di ammonio viene modificato mediante aggiunta di un tampone fosfato di Sorensen, per mantenere il pH del reagente, e di timerosale come agente antibatterico.

Principio della procedura

Il sangue intero viene aggiunto al diluente, che per la sua tonicità provoca la lisi degli eritrociti ma lascia intatti reticolociti, leucociti e piastrine. Una volta terminata la lisi degli eritrociti, la soluzione appare rosso chiaro e si può eseguire la conta. Il sangue diluito viene posto in un emocitometro secondo la tecnica abituale. Lasciare depositare le cellule per dieci (10) minuti prima di procedere alla conta dei leucociti e delle piastrine.

Al microscopio in campo chiaro con ingrandimento 100X i leucociti appaiono rifrangenti. A questo ingrandimento lo stroma di alcuni eritrociti può risultare evidente ma non interferisce con la conta.

Con un ingrandimento 430X al microscopio in campo chiaro, le piastrine appaiono ovali o rotonde e spesso presentano uno o più processi dendritici. Allo stesso ingrandimento con il microscopio a contrasto di fase, appaiono morfologicamente uguali rispetto al microscopio in campo chiaro, ma sono uniformemente opache con un velo rosa o porpora.

La conta leucocitaria ottenuta con il test BD Unopette™ è più precisa rispetto a quella eseguita con pipetta per leucociti Thoma e acido acetico al 3%, oppure con pipetta per eritrociti Thoma con diluente Rees-Ecker, o ancora rispetto ai risultati ottenuti con il metodo di conta elettrica del modello F Coulter Counter®*.

Test BD Unopette™

1. Flacone di BD Unopette™, contenente 1,98 ml di ossalato di ammonio tamponato all'1%
2. Pipetta capillare BD Unopette™, capacità 20 µl

Avvertenze:

Le confezioni (barattolo) di BD Unopette™ vengono inumidite per prolungare i tempi di conservazione del prodotto. Il timerosale, un conservante aggiunto sia al contenitore sia al reagente nel flacone, può causare irritazione cutanea. Il flacone, se premuto eccessivamente, può espellere parte del campione attraverso la sommità della camera di deflusso, contaminando la cute esposta. Indossare idonei dispositivi di protezione individuale (guanti, camice da laboratorio, protezione per gli occhi, ecc.) prima di eseguire la manipolazione, la diluizione dei campioni e utilizzare l'emocitometro una volta riempito.

Rapporto di diluizione

Rapporto campione/volume totale..... 1:100

Stabilità del reagente

Il sistema è stabile se conservato sotto i 30 °C (86 °F), protetto dalla luce diretta del sole e utilizzato prima della data di scadenza alle condizioni previste per il test. Non utilizzare se la soluzione reagente non è limpida.

Materiali

1. Microscopio dotato di ingrandimento 100X e 430X. Il contrasto di fase per la conta piastrinica è opzionale.
2. Emocitometro: Si raccomanda di utilizzare l'emocitometro Neubauer.
3. Piastra di Petri: Rivestire il fondo con carta da filtro umida.

Campione

Sangue capillare o venoso perfettamente miscelato con anticoagulante. Come anticoagulante si raccomanda di utilizzare EDTA. Per il prelievo di campioni di sangue venoso utilizzare una provetta BD Vacutainer® con EDTA (cfr. Note tecniche 1 e 2). Il campione diluito rimane stabile per tre (3) ore a temperatura ambiente.

Interferenze

Batteri e altre scorie possono interferire con la conta piastrinica. Tuttavia, batteri, scorie e cristalli in genere possono essere facilmente individuati per le loro proprietà rifrangenti e la mancanza del riflesso rosa o purpureo in microscopia a contrasto di fase. Con il microscopio a contrasto di fase è necessario prestare particolare attenzione per distinguere le piastrine dalle particelle estrinseche.

Conservazione

Se non è possibile eseguire la conta immediatamente dopo la diluizione, conservare il sangue a temperatura ambiente. Eseguire la conta entro tre (3) ore dalla diluizione.

*Coulter Counter® è un marchio registrato di Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California.

Procedura

1. Perforare il diaframma

Usando il cappuccio protettivo della pipetta capillare, perforare il diaframma del flacone nel modo seguente:



- a. Collocare il flacone su una superficie piana, afferrandolo con una mano, tenere l'insieme pipetta cappuccio nell'altra mano e spingere con fermezza la punta del cappuccio della pipetta attraverso il diaframma nel collo del flacone, quindi ritrarlo.



- b. Rimuovere il cappuccio dalla pipetta esercitando una torsione.

2. Aggiungere il campione

Riempire il capillare con sangue intero e trasferire nel flacone nel modo seguente:



- a. Mantenendo la pipetta quasi orizzontale, immergerne la punta nel sangue. Cfr. figure a fianco. La pipetta si riempie per capillarità. Il riempimento è completo e si arresta automaticamente quando il sangue raggiunge l'estremità interna del capillare situata nel collo della pipetta.

- b. Ripulire l'esterno della pipetta capillare dall'eccesso di sangue, assicurandosi di non rimuovere parte del campione dall'interno del capillare.



- c. Stringere leggermente il flacone per espellere l'aria, senza che fuoriesca il liquido. Mantenere la pressione sul flacone.

- d. Coprire con l'indice l'apertura della camera di deflusso della pipetta e collocarla con fermezza nel collo del flacone.

- e. Rilasciare la pressione sul flacone. Quindi togliere il dito dall'apertura della pipetta. La pressione negativa consente di aspirare il sangue nel diluente.



- f. Per lavare l'interno del capillare, stringere leggermente il flacone due o tre volte, forzando il diluente nella camera di deflusso ma senza farlo fuoriuscire, e rilasciare la pressione ogni volta per far tornare la miscela nel flacone. Cfr. la sezione **Attenzione**.



- g. Coprire con l'indice l'apertura superiore e capovolgere più volte con delicatezza per miscelare completamente il sangue con il diluente.

- h. Attendere dieci (10) minuti per consentire l'emolisi degli eritrociti. Quindi eseguire le conte leucocitaria e piastrinica entro tre (3) ore.

3. Caricare l'emocitometro

Miscelare accuratamente il sangue diluito capovolgendo il flacone per sospendere nuovamente le cellule (cfr. il punto 2g).



- a. Trasformare in contagocce, estraendo la pipetta dal flacone e sistemandola stabilmente in posizione inversa, come mostrato.
- b. Pulire l'interno del capillare, capovolgere il flacone, premerne delicatamente i lati ed eliminare le prime tre o quattro gocce.



- c. Caricare l'emocitometro con sangue diluito, stringendolo delicatamente i lati del flacone per espellere il contenuto fino a colmare correttamente la camera.

- d. Collocare l'emocitometro su carta da filtro umida in una capsula di Petri. Coprire la capsula di Petri e attendere dieci (10) minuti per consentire alle cellule di depositarsi (durante questa fase la carta da filtro inumidita ritarda l'evaporazione dei campioni diluiti)

4. Conta e calcolo

La conta leucocitaria viene eseguita con un emocitometro Neubauer nel modo seguente:



- a. Osservando con ingrandimento 100X, i leucociti compaiono nei nove (9) grandi riquadri della camera di conteggio.

- b. Aggiungere il 10 per cento al conteggio complessivo delle cellule (cfr. Nota tecnica 4).

- c. Moltiplicare il numero per 100 per ottenere la conta leucocitaria totale. Esempio: Se si contano 70 cellule, la conta totale è: $(70 + 7) \times 100 = 7700$ leucociti/mm³.

La conta piastrinica viene eseguita con un emocitometro Neubauer nel modo seguente:



- Osservando con un microscopio in campo chiaro o in contrasto di fase a 430X, le piastrine compaiono nei 25 piccoli riquadri all'interno del grande riquadro centrale.
- Multiply number of platelets counted by 1000 to get total platelet count.

Esempio: Sf 150 platelets are counted, total count is: $150 \times 1000 = 150,000$ platelets/cu mm.

Nota: Se si utilizza un emocitometro diverso, i calcoli devono essere modificati in funzione del dispositivo specifico.

Limiti del metodo

Una conta leucocitaria o piastrinica particolarmente elevata può rendere difficile un conteggio accurato. In entrambi i casi è opportuno procedere a una seconda diluizione. Per eseguire la conta totale, modificare le formule, tenendo conto della seconda diluizione.

Prestazioni attese

- Raffronto della conta piastrinica di 526 campioni di sangue, condotta in doppio con il modello F Coulter Counter® e il test BD Unopette™.

	Piastrine per mm ³	
	Test BD Unopette™	Modello F Coulter Counter®
Media	244.900	207.700
Precisione con deviazione standard mediante raffronto delle due misurazioni	± 15.400	± 15.700
Coefficiente di variazione	6,3%	7,6%

- Precisione delle conte leucocitarie e piastriniche usando il test BD Unopette™.

Conta leucocitaria

Determinazione (n)	40
Media	5221 leucociti / mm ³
Deviazione standard	± 382 leucociti / mm ³
Coefficiente di variazione	7,3%

Conta piastrinica

Determinazione (n)	18
Media	03.000 piastrine / mm ³
Deviazione standard	± 18.000 piastrine / mm ³
Coefficiente di variazione	5,9%

Note tecniche

- Le piastrine vengono attivate per contatto superficiale e si aggregano. Se i campioni vengono raccolti in provette sottovuoto, capovolgerle 8-10 volte subito dopo il riempimento. Un ritardo nella miscelazione potrebbe determinare l'aggregazione delle piastrine e condurre a risultati errati.
- Anche eccessivi traumi tessutali durante il prelievo ematico possono provocare l'aggregazione delle piastrine e ridurre l'accuratezza della conta piastrinica. Se si osservano aggregati piastrinici in un emocitometro, è necessario prelevare un altro campione ematico.
- Per evitare errori nelle procedure di conteggio manuale, le cellule e il diluente devono essere miscelati adeguatamente e le camere di conteggio devono essere riempite correttamente.
- Questa fase semplifica il calcolo che comporta la divisione del numero di cellule per il numero di riquadri contati e la moltiplicazione per 10 per correggere la profondità della camera.

Riferimenti bibliografici

- Brecher G, Cronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets, J Appl Physiol 3:365 (Dec) 1950.

Attenzione:

Trattare tutti i campioni biologici e i prelievi ematici secondo le direttive e le procedure del proprio istituto.

Tutti i dispositivi in vetro sono potenzialmente soggetti a rotture: adottare le opportune misure precauzionali.

Sottoporsi agli opportuni accertamenti diagnostici in caso di esposizione a campioni biologici (ad es. punture accidentali), in quanto i campioni possono trasmettere epatite virale, HIV (AIDS) o altre malattie infettive.

Smaltire i prodotti contaminati dal sangue negli appositi contenitori per materiali a rischio biologico.