

UNA ESPERIENZA DI TRATTAMENTO DEGLI STRISCI EMATICI CON FLUOROCROMI

**APPUNTI AD USO DEI MICROSCOPISTI
DILETTANTI**

Marco Brusadin

**ROMA - 2010
– *PRO MANUSCRIPTO* –**

AVVERTENZE SUL COPYRIGHT



Questi APPUNTI su UNA ESPERIENZA DI TRATTAMENTO DEGLI STRISCI EMATICI CON FLUOROCROMI sono rivolti ai Microscopisti dilettanti.

Sono stati rilasciati - a titolo completamente gratuito - sotto la Licenza: **Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.**

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/>.

L'OPERA È MESSA A DISPOSIZIONE SULLA BASE DEI TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA "CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENCE" ('CCPL' O 'LICENZA').

L'OPERA È PROTETTA DAL DIRITTO D'AUTORE E/O DALLE ALTRE LEGGI APPLICABILI.

OGNI UTILIZZAZIONE DELL'OPERA CHE NON SIA AUTORIZZATA AI SENSI DELLA PRESENTE LICENZA O DEL DIRITTO D'AUTORE È PROIBITA.

CON IL SEMPLICE ESERCIZIO SULL'OPERA DI UNO QUALUNQUE DEI DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI, TU ACCETTI E TI OBBLIGHI A RISPETTARE INTEGRALMENTE I TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA AI SENSI DEL PUNTO 8.f.

IL LICENZIANTE CONCEDE A TE I DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI A CONDIZIONE CHE TU ACCETTI DI RISPETTARE I TERMINI E LE CONDIZIONI DI CUI ALLA PRESENTE LICENZA.



Creative Commons License Deed

Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 2.5 Italia

Tu sei libero:

- di riprodurre, distribuire, comunicare al pubblico, esporre in pubblico, rappresentare, eseguire e recitare quest'opera



Alle seguenti condizioni:

- **Attribuzione.** Devi attribuire la paternità dell'opera nei modi indicati dall'autore o da chi ti ha dato l'opera in licenza e in modo tale da non suggerire che essi avallino te o il modo in cui tu usi l'opera.

Non commerciale. Non puoi usare quest'opera per fini commerciali.

- **Non opere derivate.** Non puoi alterare o trasformare quest'opera, né usarla per crearne un'altra.

- Ogni volta che usi o distribuisi quest'opera, devi farlo secondo i termini di questa licenza, che va comunicata con chiarezza.
- In ogni caso, puoi concordare col titolare dei diritti utilizzi di quest'opera non consentiti da questa licenza.
- Questa licenza lascia impregiudicati i diritti morali.

Le utilizzazioni consentite dalla legge sul diritto d'autore e gli altri diritti non sono in alcun modo limitati da quanto sopra.

Questo è un riassunto in linguaggio accessibile a tutti del [Codice Legale \(la licenza integrale\)](#).

PREFAZIONE

Queste brevissime NOTE traggono origine da una semplice esperienza eseguita per verificare se fosse o meno possibile trattare con fluorocromi (e poi sottoporre ad indagine microscopica a Fluorescenza) gli strisci ematici già allestiti.

Il fluorocromo usato è stata la Fluoresceina in polvere disciolta in concentrazione dell'1 % in Soluzione salina fisiologica (NaCl allo 0,9% in H₂O).

La concentrazione normalmente consigliata è dello 0,1 - 1 % di Fluoresceina: meglio sarebbe usare l'Isotiocianato di Fluoresceina (FITC), ma per i miei scopi non è indispensabile ricorrevi.

Queste poche righe sono dirette ai microscopisti dilettanti a puro scopo di condivisione, senza alcuna pretesa didattica o di altro genere.

Rammento agli eventuali sperimentatori che, nonostante la Fluoresceina non presenti particolari rischi di tossicità, è sempre buona norma trattare con le opportune precauzioni qualsiasi sostanza o prodotto chimico.

Per lo smaltimento, è assolutamente da proscrivere l'uso della rete fognaria domestica! Ci si rivolga, piuttosto, a Ditte specializzate o per lo meno al proprio Farmacista il quale saprà certamente consigliare in merito.

Raccomando, prima di pungersi il dito per ottenere le poche gocce di sangue necessarie per ripetere l'esperimento, una accurata pulizia e disinfezione della cute e l'uso di un ago sterile (vanno benissimo quelli normalmente usati per l'autodeterminazione della glicemia, reperibili in Farmacia o in Sanitaria).

La massima attenzione va prestata nell'uso della Lampada di Wood o di altra sorgente di luce Ultravioletta (UV): gli occhi vanno protetti con gli appositi occhiali e, comunque, è buona norma evitare assolutamente di guardare direttamente la sorgente luminosa.

Qualora, poi, si decidesse di utilizzare un microscopio a Fluorescenza per osservare i risultati delle preparazioni, raccomando l'uso degli appositi Filtri di sbarramento da inserire nel percorso ottico secondo le istruzioni del fabbricante!

Ringrazio gli amici della Mail List di Microcosmo Italia che mi hanno indotto ad effettuare questo modestissimo esperimento che, spero, possa servire a fugare ogni dubbio in merito alle modalità di trattamento degli strisci ematici con fluorocromi in soluzione acquosa.

Roma, 2 luglio 2010

Marco Brusadin

ESPERIENZA DI TRATTAMENTO DEL SANGUE CON FLUOROCROMI, CON E SENZA FISSATIVO

a) L'esperienza è stata condotta con sangue periferico prelevato per puntura di un dito e così distribuito su tre distinti portaoggetti:

- 1) sangue strisciato ed essiccato all'aria.
- 2) sangue strisciato, essiccato all'aria e fissato (subito dopo) per 3' con Metanolo assoluto.
- 3) sangue mescolato in ragione di una goccia con 5 μ l (microlitri) di Fluoresceina (polvere) in soluzione 1% in NaCl allo 0,9% (sol. salina fisiologica) [ho usato una concentrazione 10 volte maggiore di quella consigliata (allo 0,1%) per rendere maggiormente evidente la colorazione gialla del liquido e renderlo immediatamente identificabile]. Come si può notare, lo striscio n. 3 è irregolare, poiché il sangue già trattato con Fluoresceina in soluzione acquosa è meno viscoso e meno adesivo: sarebbe necessario usare un portaoggetti preriscaldato a 37-40 °C.

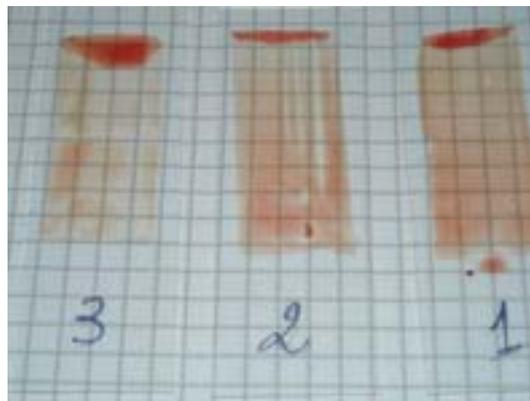


foto 1: i tre vetrini appena strisciati (il n.3 contiene sangue mescolato con Fluoresceina) durante l'essiccamento all'aria.

b) una volta completato l'essiccamento, lo striscio sul vetrino n.2 è stato fissato con Metanolo assoluto per 3' (vedi foto2).

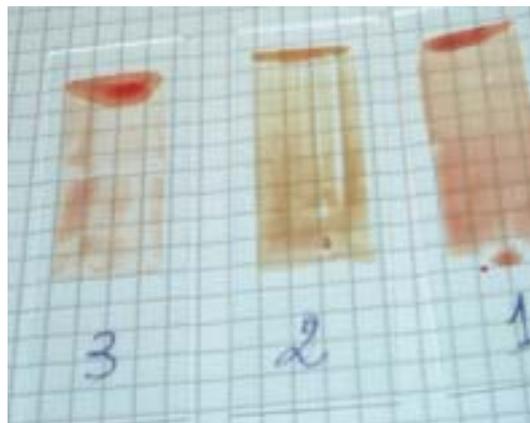


foto 2: lo striscio sul vetrino n.2 dopo fissaggio con metanolo assoluto ed essiccamento. Si noti la diversità del colore assunto dal preparato.

c) Sullo striscio del vetrino n. 1 sono stati versati 100 µl di Soluzione di Fluoresceina come precedentemente indicato. Le foto nn. 3, 4 e 5 mostrano chiaramente come il sangue strisciato viene “risospeso” nella goccia di fluorocromo, vanificando totalmente l’azione di strisciamento iniziale.

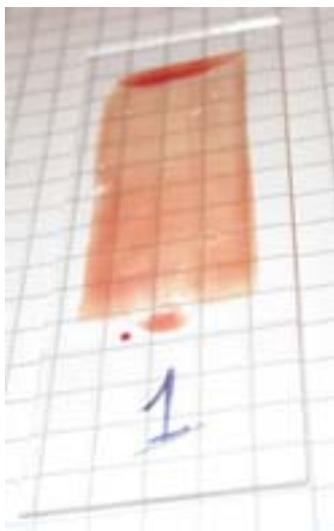


foto 3: prima dell’aggiunta della Fluoresceina

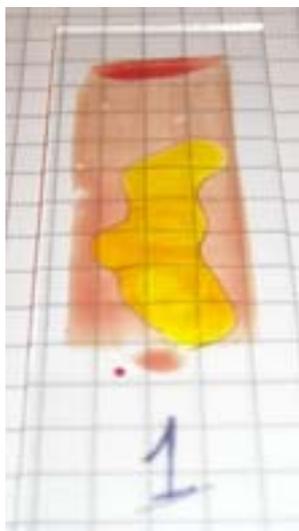


foto 4: subito dopo l’aggiunta di Fluoresceina

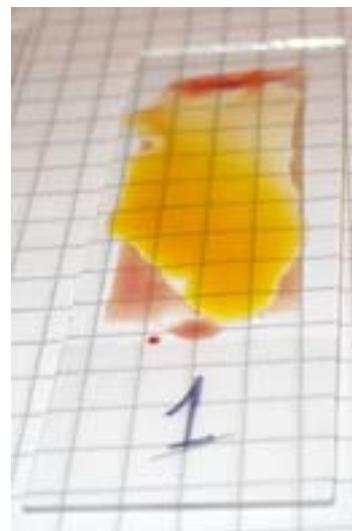


foto 5: dopo circa 30” dall’aggiunta di Fluoresceina.

d) Sullo striscio del vetrino n. 2, una volta evaporato il metanolo, sono stati versati 100 µl di Soluzione di Fluoresceina come sopra indicato. Come si può notare dalla foto n.6, inizialmente lo striscio “resiste” e non viene “risospeso”. In seguito, tuttavia, tenderà alla risospensione e al rimescolamento, anche se molto più lentamente (vedi foto n.7). Appare chiaro, tuttavia, che il fluorocromo si diffonde su tutto lo striscio, cosa che produrrà poi una intensa fluorescenza diffusa, inficiando i risultati dell’esame microscopico.



foto 6: appena dopo la deposizione della Fluoresceina sullo striscio del vetrino n.2.

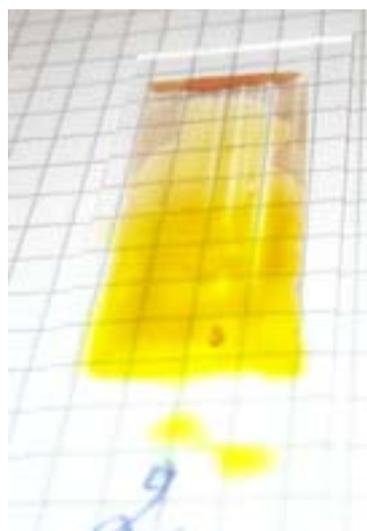


foto 7: dopo circa 2 minuti dalla deposizione della Fluoresceina.

La foto n. 8 mostra, in parallelo, i tre strisci dopo la deposizione della Fluoresceina sui vetrini nn. 1 e 2 (il vetrino n. 3 non ha ricevuto ulteriori trattamenti dopo l'essiccamento in aria).

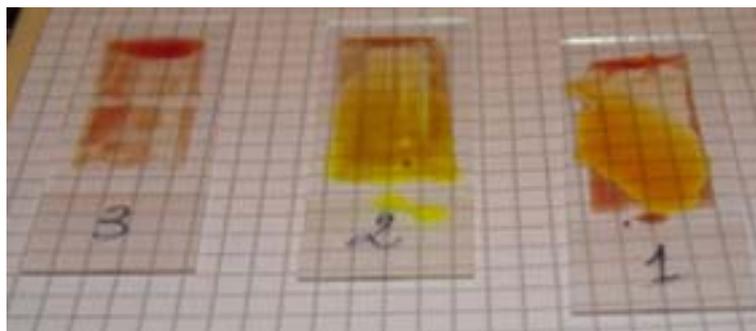


foto 8: i tre vetrini dopo l'aggiunta della Fluoresceina sugli strisci nn. 1 e 2.

e) I vetrini sono stati esposti alla luce UV della Lampada di Wood, per mostrare la fluorescenza (foto nn. 9, 10, 11 e 12).

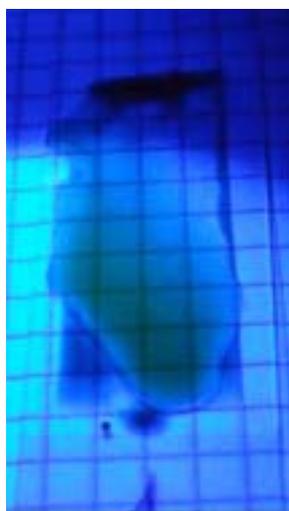


foto 9: vetrino n.1 in UV.

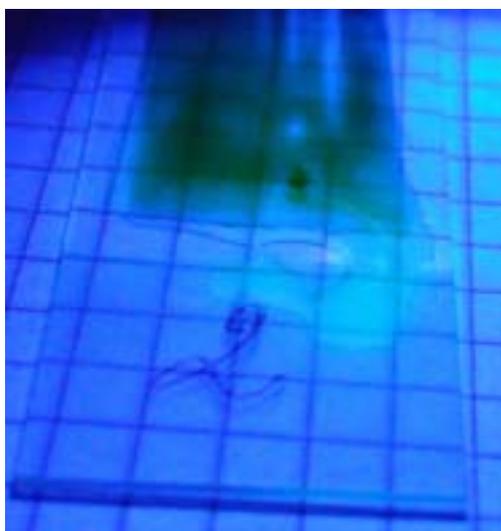


foto 10: vetrino n.2 in UV.

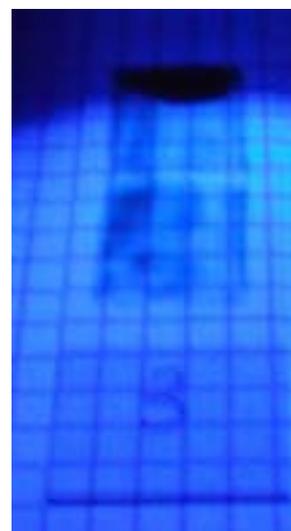


foto 11: vetrino n.3 in UV.

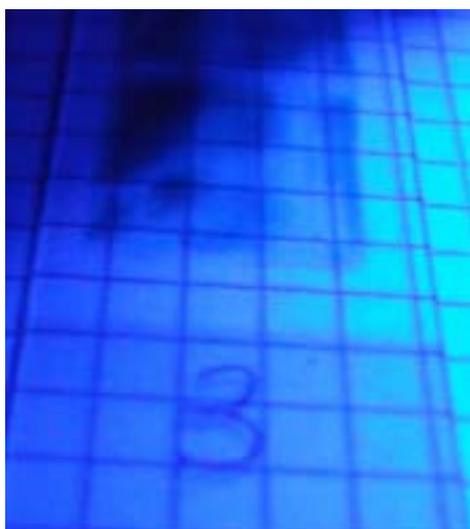


foto 12: particolare del vetrino n.3 in UV.

Si noti che lo striscio sul vetrino n.3, pur essendo stato trattato inizialmente con Fluoresceina, presenta una fluorescenza minima, quasi del tutto invisibile ad occhio nudo: l'esame al microscopio, pertanto, risulterà più agevole rispetto agli altri due preparati.

Conclusione

Alla luce dell'esperienza condotta e sopra documentata, non si ritiene consigliabile trattare con fluorocromi in soluzione acquosa gli strisci ematici già eseguiti, neppure se fissati in Metanolo o con il calore.

Ricordo che non è opportuno "montare" in Balsamo (o altri prodotti sintetici non espressamente concepiti) perché questo, con l'andare del tempo, tende a produrre un'autofluorescenza diffusa che renderebbe di difficile (se non impossibile) interpretazione lo striscio.

Qualora si voglia osservare il sangue "a fresco", conviene ricorrere alla tecnica dello schiacciamento della goccia ematica (previamente trattata con fluorocromo) tra un portaoggetti e un coprioggetti, lutando poi i bordi di quest'ultimo con paraffina fusa.