

1.16303.0002

Microscopia

LEUCOGNOST® POX

Accertamento della reazione della perossidasi in leucociti

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Kit di reattivi citochimico per la diagnosi della leucemia

Il presente kit di "LEUCOGNOST® POX - Accertamento della reazione della perossidasi in leucociti" è utilizzato per la diagnostica cellulare nell'uomo e serve per l'esame ematologico e citologico di campioni di origine umana. È un kit di colorazione che, congiuntamente ad altri prodotti diagnostici in vitro del nostro portafoglio, consente l'analisi diagnostica delle strutture bersaglio (mediante fissaggio, colorazione, eventuale controcolorazione, montaggio) nei campioni ematologici e clinici citologici, quali ad esempio strisci di sangue e di midollo osseo.

Il presente kit di colorazione è previsto per la reazione nella cuvetta da 60 ml di Hellendahl e contiene tutti i reattivi necessari per l'accertamento della reazione della perossidasi nei leucociti.

Principio

La reazione di perossidasi, in particolare la reazione di mieloperossidasi citochimicamente significativa, viene utilizzata per l'individuazione di elementi cellulari mieloidi. Il grado di maturazione dei granulociti in maturazione si può essenzialmente valutare in base all'intensità della reazione cromatica nero-marrone.

Le perossidasi sono catalasi lisosomiali, che trasferiscono l'idrogeno da un adatto donatore (in precedenza la benzidina carcinogena; in questo test: 4-cloro-1-naftolo) ad un perossido (in questo test: perossido d'idrogeno). Contemporaneamente si ossida il donatore 4-cloro-1-naftolo, che viene trasformato in un colorante insolubile nero bruno, che funge da indicatore dell'attività perossidasi.

Materiale d'esame

Quale materiale di partenza per tutte le colorazioni è necessario utilizzare preparati da citocentrifuga e strisci di sangue o midollo osseo nativo fresco. L'impiego di EDTA come anticoagulante, ad es., indebolisce notevolmente la reazione di enzimi e l'aggiunta di sostanze anticoagulanti è pertanto sconsigliato.

Reattivi

Art. 1.16303.0002
LEUCOGNOST® POX

Accertamento della reazione della perossidasi in leucociti

Componenti della confezione:

Il kit di colorazione contiene

Reattivo 1: LEUCOGNOST® POX 4-Cloro-1-naftolo 12 x 75 µmol
Reattivo 2: LEUCOGNOST® POX Tris(idrossimetil)-aminometano-HCl soluzione tampone 10 ml
Reattivo 3: LEUCOGNOST® POX Soluzione de perossido d'idrogeno 5 ml

Inoltre necessario:

Art. 100974 Etanolo 1 l, 2,5 l
denaturato con circa 1 % di metiletilchetone
p.a. EMSURE®
Art. 108562 Aquatex® flacone contagocce di 50 ml
(mezzo di montaggio acquoso)
per microscopia
Art. 109249 Emallume soluzione secondo Mayer 500 ml, 1 l,
per microscopia 2,5 l
Art. 112327 LEUCOGNOST® Miscela di fissaggio 500 ml
per citochimica enzimatica

Preparazione dei campioni

Il campionamento deve essere effettuato da personale specializzato.

Vanno utilizzati strisci di sangue o midollo osseo sottili, fatti asciugare all'aria e conservati per 3 giorni al massimo.

Gli strisci vanno fatti asciugare all'aria per minimo di 30 minuti e fissati secondo il protocollo relativo, prima della reazione citochimica.

Fissare gli strisci di sangue o di midollo osseo asciugati all'aria con la miscela di fissaggio LEUCOGNOST®	3 minuti
Risciacquare con acqua di rubinetto corrente	30 secondi
Lasciare asciugare all'aria	

Gli strisci fissati possono essere conservati in frigorifero a 3 giorni.

Tutti i campioni devono essere trattati secondo la tecnica standard vigente. Tutti i campioni vanno contrassegnati in modo tale da essere facilmente identificati.

Devono essere utilizzati strumenti adatti per il prelievo e la preparazione dei campioni; vanno osservate rigorosamente le indicazioni del produttore circa l'applicazione e le istruzioni d'uso.

Preparazione de reattivo

Preparazione di soluzione colorante

Utilizzare solamente soluzioni preparate a fresco.

Per la preparazione di ca. 600 ml di soluzione si miscelano:

Reattivo 1 (4-cloro-1-naftolo)	contenuto totale di flacone
Etanolo	15 ml
Disciogliere reattivo 1 in el etanolo e trasferire nella cuvetta da 60 ml di Hellendahl.	
Aggiungere mescolando l'acqua distillata.	45 ml
Aggiungere mescolando il reattivo 2 (tris(idrossimetil)-aminometano-HCl soluzione tampone).	10 gocce
Aggiungere mescolando il reattivo 3 (soluzione de perossido d'idrogeno).	2 gocce

La soluzione colorante preparata è incolore e stabile per 3 ore.

Esecuzione

Colorazione nella cuvetta da 60 ml di Hellendahl

I portaoggetti vanno immersi e fatti muovere brevemente nelle soluzioni; la semplice immersione non produce risultati soddisfacenti.

I portaoggetti vanno fatti sgocciolare accuratamente dopo le singole fasi della colorazione, in modo da evitare il trascinarsi (carry-over) delle soluzioni.

Per ottenere una colorazione ottimale si dovrebbero rispettare i tempi indicati.

Portaoggetti con striscio fissato	
Immergere in soluzione colorante preparata a fresco	10 minutos
Risciacquare con acqua destillata	10 secondi
Lasciare asciugare all'aria	
Controcolorare con emallume soluzione secondo Mayer	2 minutos
Risciacquare con acqua di rubinetto corrente	3 - 5 minutos
Asciugare all'aria (ad es. per una notte o a 50 °C nell'armadio di asciugatura)	
Eventualmente montare con Aquatex® e con vetrino coprioggetti.	

Per la conservazione dei preparati ematologici per più mesi, si consiglia di utilizzare mezzi di montaggio acquosi (ad es., Aquatex®) e vetrino coprioggetti. Senza montaggio, la colorazione è stabile per circa 3 giorni; in caso di montaggio con olio di immersione la colorazione è stabile solo per alcune ore.

Per l'analisi dei preparati colorati con ingrandimento al microscopio >40x, si consiglia di utilizzare olio di immersione.

Risultato

In conseguenza alla reazione di perossidasi, tutte le cellule della linea di maturazione neutrofila e in particolare eosinofila dei promielociti sono **chiaramente perossidasi-positivo quando sono visibili granuli di colore nero-marrone**. Anche i mieloblasti più maturi possono contenere singole isole perossidasi-positivo nel proprio citoplasma, anche agli stadi iniziali dello sviluppo cellulare, in cui la colorazione di Pappenheim non evidenzia ancora una granulazione primaria. Anche i monociti normali, presenti in numero prevalente, reagiscono positivamente alla perossidasi, benché la loro colorazione sia decisamente più debole rispetto ai granulociti neutrofili ed eosinofili. I granulociti basofili e tutte le cellule della linea linfatica ed eritropoietica sono perossidasi-negativi.

Valutazione

Le popolazioni di blasti leucemici, che reagiscono parzialmente o totalmente in modo positivo alla perossidasi, sono indice di leucemia mieloide acuta (LMA/AML). I linfoblasti e le cellule linfoidi importanti per la diagnosi differenziale dovrebbero sempre essere perossidasi-negativi e i corpi di Auer, presenti in caso di leucemia mieloide acuta, assumono una forte colorazione. In caso di reazione perossidasi-negativa non è tuttavia possibile escludere a priori una leucemia mieloide acuta.

Per poter distinguere chiaramente le diverse forme di leucemia mieloide acuta (mieloblastica, promielocitica e mielomonocitica), è necessario eseguire anche una reazione di esterasi. Se la reazione di esterasi positiva è inferiore al 50 %, è necessario determinare la percentuale precisa di cellule perossidasi-positivo in ciascuna popolazione blastica. Non è tuttavia necessario eseguire un'ulteriore differenziazione delle cellule perossidasi/esterasi-positivo secondo il grado di intensità.

Nelle leucemie perossidasi-positive si distinguono tre tipi di reazione:

tipo POX-1:	fino al 5 % di blasti POX-positivi	AML senza tendenza alla maturazione; non si escludono AUL o ALL
tipo POX-2:	dal 5 % al 65 % di blasti POX-positivi	AML con tendenza alla maturazione o AMMoL
tipo POX-3:	oltre il 65 % di blasti POX-positivi	AML con tendenza alla maturazione fino a AProL

AML = leucemia mieloide acuta
 AUL = leucemia indifferenziata acuta
 ALL = leucemia linfatica acuta
 AMMoL = leucemia mielomonocitica acuta
 AProL = leucemia promielocitica acuta

Annotazioni tecnici

Il microscopio utilizzato deve soddisfare i requisiti previsti in un laboratorio medico diagnostico.
 Eliminare l'olio di immersione in eccesso prima dell'archiviazione.

Diagnostica

Le diagnosi vanno eseguite solo da personale qualificato ed autorizzato.
 Devono essere utilizzate nomenclature valide.
 Ulteriori test vanno scelti ed eseguiti secondo metodi riconosciuti.
 Per ogni applicazione devono essere eseguiti controlli appropriati, per escludere possibili risultati errati.

Conservazione

Il kit di LEUCOGNOST® POX - Accertamento della reazione della perossidasi in leucociti va conservato ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C.

Stabilità

Il kit di LEUCOGNOST® POX - Accertamento della reazione della perossidasi in leucociti può essere utilizzato entro la data di scadenza indicata.

Una volta aperto il flacone, il contenuto si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata se conservato ad una temperatura compresa tra +2 °C e +8 °C.

Conservare sempre i flaconi ben chiusi.

La soluzione colorante preparata a fresco è incolore e stabile per 3 ore.

Capacità

Il kit di colorazione è sufficiente per 12 colorazioni con fino a 16 preparati.
 Nelle cuvette da 60 ml di Hellendahl con estensione (corrisponde a una esecuzione colorante), è possibile colorare contemporaneamente fino a 8 portaoggetti e fino a 16 portaoggetti posti l'uno accanto all'altro ("spalla a spalla").

Istruzioni per l'uso

Solo per uso professionale.

Per evitare errori, la applicazione deve essere eseguita da personale specializzato.
 Vanno osservate le direttive nazionali in materia di sicurezza sul lavoro e di assicurazione di qualità.

Vanno utilizzati microscopi conformi agli standard vigenti.

Protezione contro le infezioni

Vanno rigorosamente osservate le norme di laboratorio relative alla protezione contro le infezioni.

Istruzioni per lo smaltimento

La confezione deve essere smaltita nel rispetto delle vigenti direttive in materia.
 Le soluzioni usate e le soluzioni scadute vanno smaltite come rifiuti pericolosi, in conformità alle disposizioni locali vigenti in materia di smaltimento dei rifiuti.
 Per richiedere informazioni sullo smaltimento selezionare il Quick link "Hints for Disposal of Microscopy Products" all'indirizzo www.microscopy-products.com.
 Nell'Unione europea trova applicazione il Regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

Reattivi ausiliari

Art. 100974	Etanolo denaturato con circa 1 % di metiletilchetone p.a. EMSURE®	1 l, 2,5 l
Art. 104699	Olio di immersione per microscopia	flacone contagocce di 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 108562	Aquatex® (mezzo di montaggio acquoso) per microscopia	flacone contagocce di 50 ml
Art. 109249	Emallume soluzione secondo Mayer per microscopia	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 112327	LEUCOGNOST® Miscela di fissaggio per citochimica enzimatica	500 ml

Classificazione di sostanze pericolose

Art. 1.16303.0002

Osservare la classificazione delle sostanze pericolose riportata sull'etichetta e seguire le indicazioni della scheda di sicurezza.
 La scheda di sicurezza è disponibile su sito Internet e su richiesta.

Componenti principali dei prodotti

Art. 1.16303.0002

Reattivo 1	
Cloro-4-naftolo-1	75 µmol
Reattivo 2	
Tris(diossimetil) aminometano-HCl tampone	43,4 mmol
Reattivo 3	
Perossido d'idrogeno	30 g/l

Altri prodotti d'IVD

Art. 101424	Eosina-blu di metilene secondo May-Grünwald per microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109204	Giemsa soluzione azur-eosina-blu di metilene per microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 111674	Hemacolor® Colorazione rapida per strisci di sangue kit di colorazione per microscopia	1 set
Art. 116300	LEUCOGNOST®-ALPA Accertamento dell'attività della fosfatasi leucocitaria alcalina nei leucociti	12 units
Art. 116301	LEUCOGNOST®-EST Misura della reazione della esterase alfa-naftilacetato nei leucociti	12 units
Art. 116302	LEUCOGNOST® PAS Accertamento della reazione dell'acido periodico secondo Schiff nei leucociti	12 units
Art. 116304	LEUCOGNOST® AP Conferma della reazione fosfatasi acida nei leucociti	12 units
Art. 117198	LEUCOGNOST® NASDCL neo Misura della esterasi naftolo-AS-D-cloroacetato nei granulociti	12 units

Letteratura

1. Löffler, H., Rastetter, J., Haferlach, T, Atlas der klinischen Hämatologie, 2004, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing Company
3. 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



Consult instructions for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult accompanying documents



Use by YYYY-MM-DD



Temperature limitation

Status: 2017-10-04

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
 Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

