

1.16303.0002

Microscopie

LEUCOGNOST® POX

Détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Kit de réactifs cytochimiques pour le diagnostic de la leucémie

Le présent kit de « LEUCOGNOST® POX - Détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes » est utilisé pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen hématologique et cytologique d'échantillons d'origine humaine. C'est un kit de coloration, qui est utilisé conjointement avec d'autres diagnostics in vitro de notre portefeuille pour rendre des structures cibles analysables pour le diagnostic (par fixation, coloration, éventuellement contre-coloration, montage) dans des épreuves hématologiques et clinico-cytologiques, telles que les frottis de sang entier et de moelle osseuse.

Le présent kit de coloration est prévu pour la réaction en cuve de coloration de Hellendahl de 60 ml. Il contient tous les réactifs nécessaires à la détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes.

Principe

La réaction de peroxydase, principalement la réaction significative cytochimique de la myéloperoxydase, sert à la mise en évidence des éléments cellulaires myéloïques. Le degré de maturité des granulocytes arrivant à maturité est essentiellement évalué selon l'intensité de la réaction colorée brun-noir.

Les peroxydases sont des catalases lysosomales qui transfèrent un donneur approprié (autrefois la benzidine carcinogène, ici : chloro-4-naphtol-1) sur un peroxyde (ici : peroxyde d'hydrogène). Ce faisant, le donneur chloro-4-naphtol-1 est oxydé et transformé en un colorant insoluble brun noir qui peut être considéré comme un indicateur de l'activité correspondante des peroxydases.

Matériel des échantillons

Pour toutes les colorations, comme matériel de départ, il ne faut utiliser que des préparations provenant de la cytocentrifuge et des frottis de sang natif ou de moelle osseuse préparés extemporanément. L'utilisation d'EDTA p.ex. comme anticoagulant affaiblit nettement la réaction enzymatique par exemple. D'une manière générale, toute addition de substances anticoagulantes est d'ailleurs déconseillée.

Réactifs

Art. 1.16303.0002

LEUCOGNOST® POX

Détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes

Composition d'emballage :

Le kit de coloration contient

Réactif 1 : LEUCOGNOST® POX Chloro-4-naphtol-1 12 x 75 µmol

Réactif 2 : LEUCOGNOST® POX Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-HCl solution tampon 10 ml

Réactif 3 : LEUCOGNOST® POX Solution de peroxyde d'hydrogène 5 ml

Nécessaire en plus :

Art. 100974 Ethanol dénaturé avec env. 1 % d'éthylméthylcétone pour analyse EMSURE® 1 l, 2,5 l

Art. 108562 Aquatex® flacon compte-gouttes de 50 ml (produit de montage aqueux) pour la microscopie

Art. 109249 Hémalun en solution selon Mayer 500 ml, 1 l, 2,5 l pour la microscopie

Art. 112327 LEUCOGNOST® mélange de fixation pour la cytochimie d'enzymes 500 ml

Préparation des échantillons

Le prélèvement d'échantillons doit être effectué par du personnel qualifié.

Il faut utiliser des frottis sanguins ou de moelle osseuse fins, séchés à l'air et datant de 3 jours maximum.

Il est nécessaire de laisser sécher les frottis à l'air pendant 30 minutes minimum et de les fixer conformément aux instructions respectives avant la réaction cytochimique.

Fixation des frottis sanguins ou de moelle osseuse séchés à l'air dans le mélange de fixation LEUCOGNOST®	3 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante	30 secondes
Sécher à l'air	

Après la fixation, les frottis peuvent être conservés au réfrigérateur jusqu'à 3 jours.

Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art. Tous les échantillons doivent être clairement identifiés. Utiliser des instruments appropriés pour le prélèvement d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi / l'utilisation.

Préparation des réactifs

Préparation de solution de coloration

Utiliser uniquement des solutions fraîchement préparées.

Pour la préparation d'env. 60 ml de solution, il faut additionner :

Réactif 1 (chloro-4-naphtol-1)	contenu total de flacon
Ethanol	15 ml
Dissoudre le réactif 1 dans l'éthanol et l'introduire dans la cuve de coloration de Hellendahl de 60 ml.	
Ajouter de l'eau distillée en agitant.	45 ml
Ajouter réactif 2 (tris(hydroxyméthyl)-aminométhane)-HCl solution tampon) en agitant.	10 gouttes
Ajouter réactif 3 (solution de peroxyde d'hydrogène) en agitant.	2 gouttes

La solution de coloration préparée est incolore et stable pendant 3 heures.

Mode opératoire

Coloration dans la cuve de coloration de Hellendahl de 60 ml

Il est nécessaire de plonger et de déplacer brièvement les lames porte-objets dans les solutions ; une simple introduction donne des résultats de coloration insuffisants.

Les lames porte-objets doivent être égouttées conformément aux procédures de coloration pour éviter tout transfert non nécessaire des solutions.

Pour obtenir un résultat de coloration optimal, il convient de respecter les durées indiquées.

Porte-objet avec frottis fixé	
Immerger dans la solution de coloration préparée extemporanément	10 minutes
Rincer à l'eau distillée	10 secondes
Sécher à l'air	
Contre-colorer avec l'hémalun en solution selon Mayer	2 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante	3 - 5 minutes
Sécher à l'air (p.ex. pendant toute une nuit, ou à 50 °C dans l'armoire de séchage)	
Monter le cas échéant avec Aquatex® et une lamelle ouvre-objets.	

Pour stocker les préparations hématologiques pendant plusieurs mois, il est recommandé de les monter à l'aide d'un milieu de montage aqueux (p.ex. Aquatex®) et d'une lamelle couvre-objets. Sans montage, la coloration est stable environ 3 jours, et sous huile à immersion, pendant quelques heures seulement.

Pour l'examen microscopique de préparations colorées avec un grossissement >40x, il est recommandé d'utiliser de l'huile d'immersion.

Résultat

Suite à la réaction des peroxydases, toutes les cellules de la lignée de maturation des neutrophiles, et en particulier des éosinophiles à partir des promyélocytes, sont **clairement positives au test de peroxydase lorsqu'elles présentent des granules de couleur brun-noire**. De même, les myéloblastes plus mûrs peuvent contenir dans leur cytoplasme des îlots fermenteurs isolés positifs au test de peroxydase, même lors de stades de développement cellulaire précoces où la coloration de Pappenheim ne présente pas encore de granulation primaire. La quantité prédominante des monocytes normaux réagit également de manière positive au test de peroxydase ; la coloration est toutefois nettement plus faible par rapport aux granulocytes neutrophiles et éosinophiles. Les granulocytes basophiles, ainsi que toutes les cellules de la série lymphatique et érythroïdique sont négatifs au test de peroxydase.

Evaluation

Les populations de blastes leucémiques partiellement ou complètement positives au test de peroxydase mettent en évidence une leucémie myéloïde aiguë (LMA/AML). Les lymphoblastes et les cellules lymphoïdes, importants du point de vue du diagnostic différentiel, sont toujours négatifs au test de peroxydase, et les bâtonnets d'Auer, indicateurs d'une leucémie myéloïde aiguë, sont colorés de manière très prononcée. En cas de réaction négative au test de peroxydase, une leucémie myéloïde aiguë n'est pourtant pas exclue d'emblée.

Afin de pouvoir identifier clairement les différentes formes de leucémie myéloïde aiguë (myéloblastique, promyélocytaire et myélomonocytaire), il est également nécessaire de réaliser une réaction des estérases. Si la réaction des estérases est positive à moins de 50 %, le pourcentage exact des cellules positives au test de peroxydase dans la population respective de blastes doit être calculé. Une différenciation supplémentaire des cellules positives au test de peroxydase/estérase, par intensité, n'est pourtant pas requise.

Lors de leucémies positives au test de peroxydase, on différencie trois types de réaction :

Type POX-1 :	jusqu'à 5 % de blastes positifs POX	AML sans tendance à la maturité ; AUL ou ALL non exclu
Type POX-2 :	5 % à 65 % de blastes positifs POX	AML avec tendance à la maturité ou AMMoL
Type POX-3 :	plus de 65 % de blastes positifs POX	AML avec tendance à la maturité jusqu'à AProL

AML = leucémie aiguë myéloblastique
AUL = leucémie aiguë indifférenciée
ALL = leucémie lymphatique aiguë
AMMoL = leucémie aiguë myélomonozytaire
AProL = leucémie aiguë promyélocytaire

Remarques techniques

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux.

Éliminer l'excédent d'huile pour immersions avant l'archivage.

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes autorisées et formées.

Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées.

Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues. Chaque étape doit être effectuée sous contrôle, afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné.

Stockage

Stocker le kit de LEUCOGNOST® POX - Détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes entre +2 °C et +8 °C.

Stabilité

Le kit de LEUCOGNOST® POX - Détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée.

Après la première ouverture du flacon, conserver entre +2 °C et +8 °C et utiliser jusqu'à la date de péremption.

Tenir les flacons toujours bien fermés.

La solution de coloration préparée extemporanément est incolore et stable pendant 3 heures.

Capacité

Le kit de coloration suffit pour 12 colorations avec jusqu'à 16 préparations.

Les cuves de coloration de Hellendahl de 60 ml avec extension (correspond à un processus de coloration) sont conçues pour l'emploi simultané de 8 lames porte-objets et même de 16 si elles sont placées en quinconce.

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, l'application doit être effectuée par un personnel qualifié. Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance de la qualité.

Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Éliminer l'emballage conformément à la réglementation en vigueur.

Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l'élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.products-for-microscopy.com. Au sein de l'UE s'applique le règlement CE n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art. 100974	Ethanol dénaturé avec env. 1 % d'éthylméthylcétone pour analyse EMSURE®	1 l, 2,5 l
Art. 104699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 108562	Aquatex® (produit de montage aqueux) pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 50 ml
Art. 109249	Hémalun en solution selon Mayer pour la microscopie	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 112327	LEUCOGNOST® mélange de fixation pour la cytochimie d'enzymes	500 ml

Classification des matières dangereuses

Art. 1.16303.0002

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur le site web et sur demande.

Composants principaux des produits

Art. 1.16303.0002

Réactif 1	
Chloro-4-naphthol-1	75 µmol
Réactif 2	
Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-HCl tampon	43,4 mmol
Réactif 3	
Peroxyde d'hydrogène	30 g/l

Autres produits d'IVD

Art. 101424	May-Grünwald en solution d'éosine-bleu de méthylène modifiée pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109204	Azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 111674	Hemacolor® Coloration rapide des frottis de sang coffret de coloration pour la microscopie	1 set
Art. 116300	LEUCOGNOST® ALPA Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire dans les leucocytes	12 units
Art. 116301	LEUCOGNOST® EST Détection de la réaction alpha-naphtylacétate-estérase dans les leucocytes	12 units
Art. 116302	LEUCOGNOST® PAS Détection de la réaction acide périodique Schiff dans les leucocytes	12 units
Art. 116304	LEUCOGNOST® AP Détection de la réaction des phosphatases acides dans les leucocytes	12 units
Art. 117198	LEUCOGNOST® NASDCL néo Mise en évidence de naphtol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes	12 units

Littérature

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

