

1.17198.0001

## Microscopie

### LEUCOGNOST® NASDCL néo

Mise en évidence de naphthol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes

IVD

Dispositif médical de diagnostic in vitro



Kit de réactifs cytochimiques pour le diagnostic de la leucémie

Le présent kit de « LEUCOGNOST® NASDCL néo - Mise en évidence de naphthol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes » est utilisé pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen hématologique, cytologique histologique 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, clinico-cytologiques et histologiques, telles que les frottis de sang entier et de moelle osseuse ou ponctions de la crête iliaque.

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 visualisation de la naphthol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes.

#### Principe

La naphthol AS-D chloracétate estérase produit l'hydrolyse enzymatique du naphthol AS-D chloracétate en un composé de naphthol. Celui-ci réagit avec un sel de diazonium formant un colorant azoïque rouge insoluble dans l'eau.

#### Matériel des échantillons

Pour toutes les colorations, comme matériel de départ, il ne faut utiliser que des préparations provenant de la cyto centrifuge et des frottis de sang natif ou de moelle osseuse préparés extemporanément. L'utilisation d'EDTA comme anticoagulant affaiblit quelque peu la réaction enzymatique. L'héparine de lithium comme additif anticoagulant serait plus convenable.

Coupes de tissu fixé à la formaline, le cas échéant décalcifié, et inclus en paraffine (coupes de paraffine de 2 à 3 µm d'épaisseur)

Matériel histologique (p.ex. ponctions de la crête iliaque)

#### Réactifs

Art. 1.17198.0001

LEUCOGNOST® NASDCL néo

Mise en évidence de naphthol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes

#### Composition d'emballage:

Le kit de coloration contient

Réactif 1: LEUCOGNOST® NASDCL néo	Concentré tampon tris	2x 62 ml
Réactif 2: LEUCOGNOST® NASDCL néo	Naphthol AS-D chloracétate	12x 20 mg
Réactif 3: LEUCOGNOST® NASDCL néo	Diméthylformamide (DMF)	1x 13 ml
Réactif 4: LEUCOGNOST® NASDCL néo	Pararosaniline en solution	12x 1 ml
Réactif 5: LEUCOGNOST® NASDCL néo	Sodium nitrite en solution	1x 7 ml

#### Nécessaire en plus:

Art. 108562	Aquatex® (produit de montage aqueux) pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 50 ml
Art. 112327	LEUCOGNOST® mélange de fixation pour la cytochimie d'enzymes	500 ml

#### pour la coloration des frottis séchés à l'air :

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

#### pour la coloration des coupes de paraffine :

Art. 105175	Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II pour la microscopie	500 ml, 2,5 l
-------------	---	---------------

#### Préparation des échantillons

##### Frottis séchés à l'air

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®	1 - 3 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante	10 secondes
Sécher à l'air	

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

#### Préparation de ponctions moelle osseuse et crêtes iliaques

Des résultats optimaux seront obtenus en utilisant OSTEOSOFT® solution de décalcification douce, art. 101728.

Les ponctions fixées sont conservées pendant 18 - 24 heures dans OSTEOSOFT® pour une décalcification soignée et transférées ensuite au processus histologique.

Les petits blocs sont coupés avec précaution et sont ensuite traités, si nécessaire, pendant 20 minutes avec OSTEOSOFT®.

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

##### Solution de coloration

Utiliser uniquement des solutions fraîchement préparées.

Préparer la solution de coloration juste avant utilisation et l'éliminer immédiatement après la coloration.

Un retard de 5 minutes de l'immersion dans la solution de coloration peut déjà entraîner une atténuation du résultat. La solution de coloration préparée **peut être utilisée pendant 35 minutes au maximum.**

Pour la préparation de solution de coloration, il faut additionner:

Eau distillée	50 ml
Réactif 1 (concentré tampon tris)	10 ml
Dissoudre totalement le réactif = <b>solution A</b>	

Réactif 3 (diméthylformamide)	1 ml
Reagenz 2 (Naphthol AS-D Chloracetat)	1 flacon
Ajouter le réactif 3 au réactif 2 en pipettant Dissoudre totalement les réactifs = <b>solution B</b>	

Ajouter la solution B à la solution A (rincer avec quelques ml de solution A), bien mélanger  
= **solution C** (la solution est laiteuse et trouble)

Réactif 5 (sodium nitrite en solution)	15 gouttes
Réactif 4 (pararosaniline en solution)	1 flacon
Ajouter le réactif 5 à la le réactif 4 et mélanger = <b>solution D</b>	

Ajouter la solution D à la solution C (rincer avec quelques ml de solution C), mélanger et filtrer à travers un filtre en papier  
= **solution de coloration\***

\* La solution de coloration préparée doit être utilisée immédiatement après la filtration.

#### Mode opératoire

##### Frottis séchés à l'air

##### Coloration dans la cuve de coloration de Hellendahl de 60 ml

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 <b>préparée extemporanément</b>	30 minutes
Agiter vigoureusement dans de l'eau distillée	
Immerger dans l'eau distillée	5 minutes
Contre-colorer avec l'hémalun en solution selon Mayer	5 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante	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 couvre-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 5 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.

## Coupes de paraffine

### Coloration dans la cuve de coloration de Hellendahl de 60 ml

Déparaffiner les préparations histologiques de la manière habituelle et les réhydrater par une série d'alcools à concentration décroissante.

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 préparation histologique	
Eau distillée	10 secondes
Immerger dans la solution de coloration <b>préparée extemporanément</b>	30 minutes
Agiter vigoureusement dans de l'eau distillée	
Immerger dans l'eau distillée	3 minutes
Contre-colorer avec l'Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II	2 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante	5 minutes
Monter avec Aquatex® et une lamelle couvre-objets.	

## Résultat

Granulocytes neutrophiles rouge  
Noyaux cellulaires bleu

La réaction des estérases avec la naphtol AS-D chloracétate est nette dans les granulocytes matures et immatures.

On peut mettre en évidence une activité enzymatique intense dans les myélocytes, les métamyélocytes et les mastocytes tissulaires. Avec des granulocytes à noyaux en bâtonnet on obtient des réactions plus faibles.

Des activités enzymatiques ont été décelées en partie dans les myéloblastes leucémiques, les promyélocytes et dans les corps d'Auer. Les monocytes sont quelquefois actifs.

Les éosinophiles, les basophiles, les mégacaryocytes, les lymphocytes, les cellules plasmiques et les précurseurs des globules rouges ne réagissent pas ou très faiblement.

## Diagnostic d'erreurs

Les méthodes de détection d'enzymes peuvent s'avérer difficiles et nécessitent d'être réalisées avec le plus grand soin.

### Frottis séchés à l'air

Image au microscope	Cause possible	Solution proposée
Réaction trop faible	Du sang avec des anti-coagulants (EDTA/citrate) a été utilisé	Utiliser de l'héparine de lithium comme anticoagulant
Précipitation rougeâtre	La solution de coloration se floccule	Filter la solution de coloration, cf. « Préparation des réactifs »
Réaction trop faible	Frottis trop épais	Frottis plus fin
Réaction très faible	La solution de coloration n'a pas été utilisée immédiatement	Placer les préparations dans la solution de coloration immédiatement après les avoir préparées

### Coupes de paraffine

Image au microscope	Cause possible	Solution proposée
Réaction trop faible	Coupe trop épaisse	Coupes plus fines, max. 2 à 3 µm
Coloration des noyaux cellulaires trop forte	Solution d'hématoxyline ou temps d'incubation ne conviennent pas	Contre-coloration avec de Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II, cf. « Mode opératoire - Coupes de paraffine »
Réaction trop faible	Superposition de la réaction parce que la solution d'hématoxyline est trop forte	Contre-coloration avec de Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II, cf. « Mode opératoire - Coupes de paraffine »
Fond du porte-objet légèrement rougeâtre	Porte-objets enduits	Utiliser des porte-objets non enduits
Réaction très faible	La solution de coloration n'a pas été utilisée immédiatement	Placer les préparations dans la solution de coloration immédiatement après les avoir préparées

## Remarques techniques

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

Dans les frottis de sang, il peut apparaître un précipité finement granulé peu important et qui n'a aucune influence sur les résultats diagnostiques. Eliminer 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® NASDCL néo - Mise en évidence de naphtol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes entre +2 °C et +8 °C.

## Stabilité

Le kit de LEUCOGNOST® NASDCL néo - Mise en évidence de naphtol AS-D chloracétate estérase dans les granulocytes 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 doit être utilisée immédiatement après la filtration

Un retard de 5 minutes de l'immersion dans la solution de coloration peut déjà entraîner une atténuation du résultat. La solution de coloration préparée peut être utilisée pendant 35 minutes au maximum.

## 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.

En cas de besoin, utiliser une centrifugeuse conforme à la norme de laboratoire et aux critères.

## Protection contre les infections

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

## Consignes d'élimination

Eliminer 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](http://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. 101728	OSTEOSOFT® solution de décalcification douce pour l'histologie	1 l, 10 l Titripac®
Art. 104699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 105175	Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II pour la microscopie	500 ml, 2,5 l
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. 1.17198.0001

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. 1.17198.0001  
(indications par flacon)

Réactif 1	
Tampon tris	40,1 mmol
Réactif 2	
Naphtol AS-D chloracétate	0,056 mmol
Réactif 3	
Diméthylformamide	167,19 mmol
Réactif 4	
Pararosaniline	0,062 mmol
Réactif 5	
Nitrite de sodium	10,14 mmol

## 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. 116303	LEUCOGNOST® POX Détection de la réaction de peroxydase dans les leucocytes	12 units
Art. 116304	LEUCOGNOST® AP Détection de la réaction de phosphatases acides dans les leucocytes	12 units



Consult instructions  
for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult  
accompanying documents



Use by  
YYYY-MM-DD



Temperature  
limitation

Status: 2017-03-24

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

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

