

1.16301.0002

Microscopie

LEUCOGNOST® EST

Détection de la réaction alpha-naphtylacétate-estérase dans les leucocytes

IVD

Dispositif médical de diagnostic in vitro



Kit de réactifs cytochimiques pour le diagnostic de la leucémie

Le présent kit de « LEUCOGNOST® EST - Détection de la réaction alpha-naphtylacétate-estérase 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 alpha-naphtylacétate-estérase dans les leucocytes.

Principe

Les réactions de l'estérase avec différents substrats facilitent la distinction entre les leucémies myéloblastes et monoblastes. A l'exception de la réaction naphthol-AS-D-chloroacétate estérase, dont l'exactitude est comparable à celle de la réaction avec les peroxydases, la réaction avec la naphtylacétate-estérase convient le mieux pour la délimitation des leucémies monoblastes.

Les estérases naphtyl-1-acétate accélèrent la scission hydrolytique de naphtyl-1-acétate en acide acétique et naphthol-1, qui est couplé avec un sel de diazonium pour former un colorant azoïque rouge-brun insoluble dans l'eau.

Matériel d'échantillon

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 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. 1.16301.0002

LEUCOGNOST® EST

Détection de la réaction alpha-naphtylacétate-estérase dans les leucocytes

Composition d'emballage :

Le kit de coloration contient

Réactif 1 : LEUCOGNOST® EST Tampon phosphate

Réactif 2 : LEUCOGNOST® EST Naphtyl-1-acétate

Réactif 3 : LEUCOGNOST® EST Solution de pararosaniline-HCl

Réactif 4 : LEUCOGNOST® EST Nitrite en solution

1 cuiller

Nécessaire en plus :

Art. 100014 Acétone pour analyses EMSURE® 1 l, 2,5 l, 5 l
ACS, ISO, Reag. Ph Eur

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,
pour la microscopie 2,5 l

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

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®	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.

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.

Réactif 1 (tampon phosphate)	2 cuillers arasées (jointe ; 1 cuiller = 0,8 g)
Eau distillée	60 ml
Dissoudre totalement le réactif = solution A	

Réactif 2 (naphtyl-1-acétate)	contenu entier de flacon
Acétone	2 ml
Dissoudre totalement le réactif dans l'acétone et ajouter en agitant et remuant vigoureusement à la solution A = solution B	

Réactif 3 (solution de pararosaniline-HCl)	4 - 5 gouttes (0,2 ml)
Réactif 4 (Nitrite en solution)	4 - 5 gouttes (0,2 ml)
Mélanger dans le flacon vidé du réactif 2 et laisser reposer 1 minute (temps de diazotation) = solution C	
Mélanger bien les solutions B et C	
filtrer sur un filtre rapide dans la cuve de coloration de Hellendahl = solution de coloration	

La solution de coloration préparée est utilisable durant 2,5 heures au maximum. La coloration devrait donc se faire au plus tard 15 min après la préparation.

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 Incubation à l'obscurité	1 - 2 heures
Rincer à l'eau distillée	10 secondes
Contre-colorer avec l'hémalun en solution selon Mayer	30 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante (bleuir)	2 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.

Résultat

L'activité estérasiq ue à l'alpha-naphtyl acétate est présente dans toutes les cellules de l'hématopoïèse à une faible réactivité. Principalement ce sont les monocytes, les plasmocytes, les érythroblastes et les mégacaryocytes qui réagissent de façon plus marquée. Les granulations rouge brun qui apparaissent dans la mise en œuvre de cette coloration cytochimique permettent d'identifier de manière pratiquement unique les seuls monoblastes / monocytes leucémiques en raison de leur forte réactivité.

Evaluation

Pour la classification des leucémies aiguës, on définit le pourcentage de blastes positifs pour l'estérase, tout en tenant compte de la gradation de la réaction peroxydase selon l'échelle suivante :

Type peroxydases :	moins de 25 % de blastes positifs à EST	AML, AProL
Type mixte POX-EST :	25 % - 50 % de blastes positifs à EST	AMMoL
Type estérases :	plus de 50 % de blastes positifs à EST	AMoL

AML = leucémie aiguë myéloblastique
AProL = leucémie aiguë promyélocytaire
AMMoL = leucémie aiguë myélomonocytaire
AMoL = leucémie aiguë monocytaire

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® EST - Détection de la réaction alpha-naphtylacétate-estérase dans les leucocytes entre +2 °C et +8 °C.

Stabilité

Le kit de LEUCOGNOST® EST - Détection de la réaction alpha-naphtylacétate-estérase 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 stable pendant 2,5 heures 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.

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.microscopy-products.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. 100014	Acétone pour analyses EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	1 l, 2,5 l, 5 l
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. 1.16301.0002

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. 1.16301.0002

Réactif 1	
Tampon phosphate	80 mmol
Réactif 2	
Naphtyl-1-acétate	130 µmol
Réactif 3	
Pararosaniline-HCl	1,235 mmol/l
Réactif 4	
Nitrite en solution	5,8 mmol

Autres produits d'IVD

Art. 109204	Azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 115355	CYTOCOLOR® Coloration cytologique étalon selon Szczepanik pour la microscopie	6x 500 ml
Art. 116300	LEUCOGNOST® ALPA Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire 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 des peroxydases 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 naphthol 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: 2017-10-05

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

