

1.16300.0002

Microscopie

LEUCOGNOST® ALPA

Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire dans les leucocytes



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Kit de réactifs cytochimiques pour le diagnostic de la leucémie

Le présent kit de « LEUCOGNOST® ALPA - Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire dans les leucocytes » est utilisé pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen hématologique et cyto- logique 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 l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire (ALPA) dans les leucocytes.

Principe

Pour une délimitation cytochimique d'une leucémie chronique myéloïde (CML) par rapport aux autres affections du cercle des formes myéloprolifératives, en particulier vis-à-vis de la myélofibrose et de la polycythémie ou des autres procédés inflammatoires ou tumoraux, le dosage de l'activité (indice) de la phosphatase alcaline des leucocytes est approprié. En plus, l'indice de la phosphatase alcaline des leucocytes constitue un paramètre simple pour les CML, car il reflète les différentes phases d'activité de l'affection hématologique.

La phosphatase alcaline leucocytaire catalyse l'hydrolyse des esters phosphoriques en milieu alcalin. Le naphthol-1 libéré du naphthyl-1-phosphate est couplé avec un sel de diazonium pour former un colorant azoïque brun qui précipite selon la localisation et l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules.

Matériel d'échantillon

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. 1.16300.0002

LEUCOGNOST® ALPA

Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire dans les leucocytes

Composition d'emballage :

Le kit de coloration contient

Réactif 1 : LEUCOGNOST® ALPA Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

Réactif 2 : LEUCOGNOST® ALPA Naphthyl-1-phosphate, sel de sodium

Réactif 3 : LEUCOGNOST® ALPA Variamin® sel bleu B

1 cuiller

Nécessaire en plus :

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®	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 (tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane)	4 cuillères arasées (jointe ; env. 1,1 g)
Eau distillée	100 ml
Dissoudre totalement le réactif = solution A	

Réactif 2 (naphthyl-1-phosphate, sel de sodium)	contenu entier de flacon
Solution A	15 ml
Rincer le réactif avec 15 ml de solution A dans la cuve de coloration de Hellendahl = solution B	

Réactif 3 (Variamin® sel bleu B)	contenu entier de flacon
Solution A	45 ml
Rincer le réactif avec 45 ml de solution A dans un Erlenmeyer agiter vigoureusement pendant 2 minutes filtrer sur un filtre rapide dans la cuve de coloration en soignant la coloration B bien mélanger = solution de coloration	

La solution de coloration préparée est utilisable durant 90 minutes au maximum. La coloration propre de la solution de réactif est rouge-brun et se trouble rapidement.

Le trouble n'a pas d'influence sur la qualité de la coloration.

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 - 15 minutes
Immerger dans l'eau distillée	
Sécher à l'air	
Contre-colorer avec l'hémalun en solution selon Mayer	5 minutes
Rincer à l'eau du robinet courante	1 - 3 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 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

Le produit réactionnel brun se trouve seulement dans les phases finales de la maturation de la granulopoïèse. On apprécie 100 noyaux segmentaires neutrophiles. Dans le cas d'une neutropénie jusqu'à 10 % de bâtonnets.

La numération s'effectue selon l'intensité de la coloration.

On distingue les cinq degrés d'intensité de coloration suivants :

- Degré d'intensité 0 : absence de réaction
- Degré d'intensité 1 : présence de quelques granulations isolées
- Degré d'intensité 2 : présence de plusieurs granulations localisées
- Degré d'intensité 3 : distribution diffuse des granulations
- Degré d'intensité 4 : distribution généralisée des granulations
- Degré d'intensité 5 : présence de granulations en nombre très important masquant souvent le noyau

Evaluation

Si l'on multiplie le pourcentage trouvé avec les chiffres des classes de réaction correspondantes et qu'on additionne les produits, on obtient alors l'indice de ALPA (pas de dimension).

Exemple d'évaluation :

Nombre de cellules (%)	x	Degré d'intensité	=	Produit
8	x	0	=	0
42	x	1	=	42
24	x	2	=	48
12	x	3	=	36
7	x	4	=	28
7	x	5	=	35

Somme = indice de ALPA = 189

Valeurs normales : 10 à 100

Un indice abaissé est pathognomonique pour la phase active malade d'une leucémie myéloïde chronique. Toutefois, les anémies hémolytiques, les anémies par manque de fer ou les affections virales isolées peuvent connaître des valeurs d'indice faibles comparables. Les valeurs normales et élevées ont toujours beaucoup de significations, si bien qu'elles sont sans objet pour le diagnostic différentiel. De même, des leucémies myéloïdes chroniques peuvent présenter des valeurs ALPA normales ou même plus élevées. En général, l'indice est d'autant plus élevé que le processus de dégradation nécrobiotique est prononcé (par ex. affaiblissements inflammatoires des tissus) dans le cadre des processus inflammatoires ou tumoraux.

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® ALPA - Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire dans les leucocytes entre +2 °C et +8 °C.

Stabilité

Le kit de LEUCOGNOST® ALPA - Détection de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire 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 90 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.

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. 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. 1.16300.0002

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. 1.16300.0002

Réactif 1		
Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane	130 mmol	
Réactif 2		
Naphtyl-1-phosphate, sel de sodium	120 µmol	
Réactif 3		
Variamin® sel bleu B	68 mg	

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. 109016	Neo-Mount® agent de montage anhydre pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 500 ml
Art. 109204	Azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109843	Neo-Clear® (remplaçant du xylène) pour la microscopie	5 l
Art. 115355	CYTOCOLOR® Coloration cytologique étalon selon Szczepanik pour la microscopie	6x 500 ml
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 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: 2017-09-19

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

