

INDICATIONS

La peroxydase leucocytaire de Sigma-Aldrich (Myéloperoxydase) est destinée à être utilisée dans la mise en évidence histochimique de la peroxydase leucocytaire. Les réactifs de la peroxydase leucocytaire sont destinés à un « Usage diagnostique in vitro ».

Les méthodes classiques de localisation cytochimique de la myéloperoxydase (MP) impliquent l'usage de benzidine¹ ou de diaminobenzidine.² En 1977, Hanker et al.³ ont décrit l'utilisation de p-phénylènediamine et de catéchol pour détecter la peroxydase de raifort injectée. Le système indicateur constitue la base de la procédure Sigma-Aldrich, dans laquelle la myéloperoxydase est détectée au moyen de la réaction suivante :



RÉACTIFS

TAMPON TRIZMAL™ 6,3 CONCENTRÉ, référence N° 90-3C
TRIZMA®-maléate, 200 mmol/l. Chloroforme ajouté comme conservateur.

RÉACTIF INDICATEUR PEROXYDASE, référence N° 390-1
Dichlorhydrate de p-phénylènediamine (1 part) et catéchol (2 parts).

SOLUTION D'HEMATOXYLINE ACIDE, référence N° 285-2
Hématoxyline, certifiée, 1 g/l, pH 3,3 à 25 °C.

CONSERVATION ET STABILITÉ :

Le tampon TRIZMAL™ 6,3 concentré et la solution d'hématoxyline acide doivent être conservés à température ambiante (18–26 °C).

Le réactif indicateur de la peroxydase doit être conservé au réfrigérateur (2–8 °C).

La solution d'hématoxyline acide ne doit pas être remise dans son récipient d'origine après utilisation dans une jarre de Coplin.

Conservé le peroxyde d'hydrogène à 3 % dans le PBS au réfrigérateur (2–8 °C). Éliminer en cas de développement de turbidité.

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption.

ALTÉRATION :

Éliminer le tampon TRIZMAL™ 6,3 concentré en cas de développement de turbidité.

Éliminer la solution d'hématoxyline acide lorsque la durée nécessaire à une coloration adaptée dépasse de plus de 5 minutes la durée recommandée dans la procédure.

PRÉPARATION :

Le tampon TRIZMAL™ 6,3 concentré se prépare en mélangeant 1 volume de tampon TRIZMAL™ 6,3 concentré, référence N° 90-3C, avec 9 volumes d'eau déminéralisée. Utiliser une seule fois et jeter.

Le fixateur d'éthanol à 95 % (v/v) se prépare en mélangeant 5 ml de formaldéhyde à 37 % avec 45 ml d'éthanol à 95 %. Préparer une solution fraîche chaque jour. Conservé dans un récipient bien fermé.

Le peroxyde d'hydrogène à 3 % dans le PBS se prépare en ajoutant 1 part de peroxyde d'hydrogène à 30 % à 9 parts de PBS pH 7,4. Il doit être préparé frais.

PRÉCAUTIONS :

Suivre les précautions habituelles observées lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets selon les règlements locaux, départementaux, régionaux ou nationaux en vigueur. Pour les dernières informations sur les risques ou la sécurité, se reporter à la fiche technique du produit.

Informations sur les risques et la sécurité (Etats-Unis)

Le réactif indicateur de la peroxydase est TOXIQUE. Toxique par inhalation, en cas de contact avec la peau et en cas d'ingestion. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. Indices limités d'effet carcinogène. Risque de sensibilisation suite à une inhalation ou un contact dermatique. Très toxique pour les organismes aquatiques, susceptible de provoquer des effets indésirables à long terme sur l'environnement aquatique. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). Ce matériel et son récipient doivent être éliminés de la même manière que les déchets dangereux. Éviter de le déverser dans l'environnement. Se référer aux fiches d'instructions spéciales / fiches toxicologiques.

Le tampon TRIZMAL™ concentré est NOCIF et dangereux pour l'environnement. Nocif en cas d'ingestion. Indices limités d'effet carcinogène. Nocif : risque de lésions graves en cas d'exposition prolongée, d'inhalation ou d'ingestion. Porter des vêtements protecteurs appropriés.

L'hématoxyline acide est TOXIQUE. Toxique en cas d'ingestion. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). Organes cibles : nerfs et foie.

Le formaldéhyde est TOXIQUE. Toxique par inhalation, en cas de contact avec la peau et en cas d'ingestion. Provoque des brûlures. Risque de sensibilisation suite à une inhalation ou un contact dermatique. Indices limités d'effet carcinogène. Susceptible de

provoquer des troubles génétiques héréditaires. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants, et se protéger les yeux et le visage. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). A n'utiliser que dans un lieu bien ventilé.

L'éthanol est INFLAMMABLE et IRRITANT. Hautement inflammable. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. Conservé le récipient bien fermé. Tenir éloigné des sources d'ignition – défense de fumer. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés.

Le peroxyde d'hydrogène à 30 % est OXYDANT et CORROSIF. Tout contact avec une matière combustible peut déclencher un feu. Provoque des brûlures. Tenir à l'écart des matières combustibles. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants, et se protéger les yeux et le visage. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible).

Informations sur les risques et la sécurité (Europe)

Le réactif indicateur de la peroxydase est TOXIQUE et dangereux pour l'environnement. Toxique par inhalation, en cas de contact avec la peau et en cas d'ingestion. Irritation des yeux et de la peau. Risque de sensibilisation suite à un contact dermatique. Très toxique pour les organismes aquatiques, susceptible de provoquer des effets indésirables à long terme pour l'environnement aquatique. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). Cette matière et son récipient doivent être éliminés de la même manière que les déchets dangereux. Éviter de le déverser dans l'environnement. Se référer aux fiches d'instructions spéciales / fiches toxicologiques.

L'hématoxyline acide est NOCIVE. Nocive en cas d'ingestion.

Le formaldéhyde est TOXIQUE. Toxique par inhalation, en cas de contact avec la peau et en cas d'ingestion. Provoque des brûlures. Indices limités d'effet carcinogène. Risque de sensibilisation suite à un contact dermatique. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants, et se protéger les yeux et le visage. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). A n'utiliser que dans un lieu bien ventilé.

L'éthanol est HAUTEMENT INFLAMMABLE. Hautement inflammable. Conservé le récipient bien fermé. Tenir éloigné des sources d'ignition – défense de fumer.

Le peroxyde d'hydrogène est CORROSIF. Provoque des brûlures. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau. Porter des vêtements protecteurs, ainsi qu'une protection du visage et des yeux adaptés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible).

PROTOCOLE

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS :

Il est recommandé de prélever et de conserver les échantillons conformément aux directives du Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale M29-A2. Aucune méthode d'analyse actuelle ne garantit totalement que les échantillons de sang ou de tissu ne transmettent pas d'agents infectieux. Par conséquent, tous les échantillons de sang ou de tissu doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Utiliser des frottis de sang total ou de moelle osseuse fraîchement préparés pour le dosage. Le sang peut être prélevé dans de l'héparine ou de l'EDTA. Éviter toute exposition à la lumière car la peroxydase leucocytaire est photolabile. Il a été rapporté que les frottis non fixés sont stables pendant 3 semaines lorsqu'ils sont conservés dans le noir.¹ Laisser les frottis sécher à l'air pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière, avant de les fixer.

MATÉRIELS SPECIFIQUES NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

Formaldéhyde, 37 %, solution

Ethanol à 95 % (v/v)

Soluté tampon de phosphate (PBS), pH 7,4, référence N° P 3813

Peroxyde d'hydrogène à 30 %

REMARQUES :

Il est recommandé de traiter les frottis de sang préparés à partir de donneurs sains avec les échantillons des patients pour vérifier la performance du système.

Bien que la myéloperoxydase soit généralement considérée comme un marqueur pour les cellules de lignée myélocytaire, il est impératif de reconnaître que les cellules monocytaires peuvent également présenter une faible activité de la peroxydase.

Les données obtenues avec cette procédure permettent uniquement de faciliter le diagnostic et doivent être révisées conjointement avec d'autres tests ou informations sur les diagnostics cliniques.

PROTOCOLE :

1. Fixer les frottis à température ambiante pendant 30 secondes dans un **fixateur**.
2. Laver les lames sous un filet d'eau du robinet pendant 2 minutes et laisser sécher à l'air pendant 10 minutes.
3. **Préchauffer 50 ml de tampon dilué TRIZMAL™ 6,3** dans un bain-marie de 37 °C.
4. Juste avant de l'utiliser, ajouter 1 flacon de réactif indicateur de la peroxydase, référence N° 390-1 et 200 µl (0,2 ml) de peroxyde d'hydrogène à 3 % au Trizmal™ 6,3 préchauffé. Diluer le tampon. Bien mélanger. Jeter après utilisation.
5. Placer les lames lavées et fixées (étape 2) dans un réactif indicateur de la peroxydase (étape 4) pendant 30 minutes dans le noir, dans un bain-marie de 37 °C.

- Après l'incubation, laver les lames sous un filet d'eau du robinet pendant 15 à 30 secondes et laisser sécher à l'air.
- Contre-colorer les lames dans une solution d'hématoxyline acide, référence N°. 285-2, pendant 10 minutes.
- Rincer les lames dans de l'eau déminéralisée courante pendant 15 à 30 secondes. Laisser sécher à l'air et examiner les lames au microscope.

PERFORMANCE

Les frottis sanguins préparés à partir de donneurs normaux ont été colorés pour la myéloperoxydase selon cette procédure et selon la méthode benzidine. Les polynucléaires neutrophiles ont indiqué une granulation marron noire avec cette procédure, et une granulation bleue avec la procédure benzidine. Dans les deux cas, les monocytes se sont colorés moins intensément et les lymphocytes n'ont indiqué aucune activité de la myéloperoxydase.

Si les résultats observés sont différents des résultats escomptés, contacter le Service Technique d'Assistance Sigma-Aldrich.

RÉFÉRENCES

- Kaplow SL: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood 26:215, 1965.
- Graham RC, Karnovsky MJ: The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14:291, 1966.
- Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A: A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem 9:789, 1977.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Randrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. Brit J Haematol 33:451, 1976.
- Marmont AM, Damasio E, Zucker-Franklin D: Neutrophils. In Atlas of Blood Cells-Function and Pathology, Vol. 1. Edited by D Zucker-Franklin, MF Greaves, CE Grossi, AM Marmont, Lea and Febriger, Philadelphia, 1981, pp 149-424.

Sigma-Aldrich, Inc. garantit la conformité de ses produits aux informations contenues dans cette notice et dans les autres notices Sigma-Aldrich. L'utilisateur doit s'assurer que le(s) produit(s) est/sont adapté(s) à l'utilisation qu'il souhaite en faire. D'autres conditions générales peuvent s'appliquer. Voir au verso de la facture ou du bordereau de commande les conditions de vente et autres informations.

Protocole N° 390
Révision précédente : 2003-03
Révision : 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Royaume-Uni

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 Etats-Unis +1 314 771 5765
Assistance technique : appeler en PCV au +1 314 771 3122
ou adresser un email à clintech@sial.com
Pour commander : appeler en PCV au +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Allemagne 49-7329-970