

LEUKOGNOST SPE

VERTIMAS

IVD in vitro diagnostikos medicinos prietaisai

Rinkinys specifiniam esterazės aktyvumui (Lederio dėmė, chloroacetato esterazė) nustatyti leukocituose

NAUDOJIMO INSTRUKCIJA

REF Produkto kodas: LKG-SPE (maž.iausiai 100 testų)

Įvadas

LeukoGnost SPE rinkinyje yra reagentų citocheminei leukemijos diagnostikai naudojant kaulų čiulpų ar viso kraujo tepinėlius. Šis metodas taip pat gali būti naudojamas formalinu fiksuotoms ir parafino medžiagoms, ypač kaulų čiulpų histologiniams preparatams.

Dažymo metodas pagrįstas ląstelinės esterazės gebėjimu hidrolizuoti naftolio AS-D chloroacetatą. Reakcijos metu išsiskiria laisvas naftolis, kuris jungiasi su diazonio druskomis ir reakcijos vietoje susidaro raudonos nuosėdos.

Rinkinys skirtas individualiam horizontaliai išdėstytų stiklinių tyrimui ir jame yra reagentų, skirtų maž.iausiai 100 tyrimų, skirtų rūgštinės fosfatazės aktyvumui leukocituose nustatyti. Reagentai tepami lašinant, kol bus padengtas visas stiklėlis (1-2 ml).

Produkto aprašymas

LEUKOGNOST SPE - rinkinys specifiniam esterazės aktyvumui (Lederio dėmė, chloroacetato esterazė) nustatyti leukocituose

Komplekte yra:	LKG-SPE (100 testų)	Laikymo temperatūra:
1 reagentas (natrio nitritas, tirpalas)	NAN-OT-5 (5 ml)	2-8°C
2 reagentas (paraznilinas, tirpalas)	PARA-OT-3 (3 ml)	2-8°C
3 reagentas (SPE buferis)	FOP-OT-100 (2 x 100 ml)	2-8°C
4 reagentas (SPE substratas)	NASD-OT-10 (10 ml)	2-8°C

Kiti reagentai, reikalingi dažymo metodui

- LeukoGnost Fixative (LKF-500) - fiksatorius, skirtas citocheminei leukemijos diagnostikai.
- LeukoGnost HEM (LKF-OT-500) - hematoksilinas, skirtas citocheminei leukemijos diagnostikai

arba

- LeukoGnost PLUS (LKG-PLUS) - papildomų reagentų rinkinys LeukoGnost rinkiniams

Kiti skyriai ir reagentai, kuriuos galima naudoti atliekant dažymo procedūrą

- Vandens pagrindo dengiamoji terpė mikroskopo stiklėlams ir tvirtinimo medžiaga dengiamiesiems stiklams, pvz., BioGnost BioMount Aqua terpė (BMA-30)
- BioGnost imersinės alyvos, tokios kaip imersinė alyva (IU-30) arba A tipo panardinimo alyva (IUA-30)
- Aukštos kokybės stiklėliai, skirti naudoti histopatologijoje ir citologijoje, pvz., VitroGnost SUPER GRADE, VitroGnost COLOR arba vienas iš daugiau nei 30 BioGnost VitroGnost stiklinių stiklėlių modelių
- Fiksatoriai, tokie kaip BioGnost neutralūs buferiniai formaldehido tirpalai: Formaldehidas NB 4%, Formaldehidas NB 10%
- Sausinimo/rehidratavimo priemonės, pvz., BioGnost alkoholio tirpalai: Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 ir Histanol 100
- Valymo priemonės, tokios kaip BioClear ksilenas arba pakaitalas, pvz., BioClear New agentas alifatinių angliavandenilių pagrindu
- Infiltracijos ir tvirtinimo priemonės, pvz., BioGnost granuliuotas parafinas BioWax Plus, BioWax 56/68, BioWax Blue, BioWax Micro.

Tirpalo paruošimas dažymui

Paruoškite dažymo tirpalą taip: • 1 veiksmas: sumaišykite

1 reagentą ir 2 reagentą švariame mėgintuvėlyje. Palikite 2 minutes.

- 2 veiksmas: į 1 ir 2 reagentų mišinį įpilkite 3 reagento
- 3 veiksmas: pridėkite 4 reagentą į paruoštą reagentų mišinį iš 2 žingsnio

Jei reikia, pakeiskite reagentų tūrį:

ŽINGSNIS	REAGENTAS	UŽ 1 SKYRIUS	12 SKYRIŲ	24 SKYRIUS
1 žingsnis	reagentas 1	50 µL (1 lašas)	600 µL (12 lašų)	1,2 ml (24 lašai)
	reagentas 2	25 µL (1 lašas)	300 µL (12 lašų)	600 µL (24 lašai)
2 žingsnis	3 reagentas	2 ml	24 ml	48 ml
3 veiksmas	4 reagentas	100 µL (4 lašai)	1,2 ml	2,4 ml

Sekcijos paruošimas dažymui

- Paruoškite viso kraujo arba kaulų čiulpų tepinėlių, kad jis būtų plonas ir sausas (tepinėlius džiovinkite maž.iausiai 30 min.). Šių skyrių neturi būti vyresni nei 3 dienos. Nerekomenduojama vartoti antikoagulantų, nes jie gali slopinti fermentų reakciją.
- Pataisykite sekiją taip:

1. Užtepkite tepinėlių ant stiklėlio užtepdami LeukoGnost Fixative (1-2 ml). 2. Nuplaukite stiklėlį distiliuotu vandeniu 3. Išdžiovinkite	1-3 minutes
preparatą	10 sekundžių

- Taip paruoštos ir pritvirtintos sekcijos gali būti laikomos 2-8 °C temperatūroje ir naudojamos ne ilgiau kaip 3 dienas.

PASTABA

Taikykite reagentą taip, kad jis visiškai uždengtų stiklėlį.

Prieš kiekvieną dažymą paruoškite šviežią dažymo tirpalą. Paruoštą tirpalą reikia suvartoti per 45 minutes.

A) Kraujo ir kaulų čiulpų tepinėlių dažymo procedūra

1. Ant stiklėlio užtepkite dažymo tirpalą (1-2 ml) 2. Kruopščiai nuplaukite stiklėlį distiliuotu vandeniu 3. Nudažykite	30 min
stiklėlį naudodami LeukoGnost HEM reagentą	10 sekundžių
	5 min

4. Nuplaukite stiklėlį po vandeniu iš čiaupo.	5 min
5. Išdžiovinkite preparatą	

Išdžiovinus preparatą, siekiant išsaugoti mėginio spalvą ir kokybę rekomenduojama už dengti stiklą su BioMount Aqua medium.

Histologinių pjūvių paruošimas dažymui

- Pritvirtinkite mėginį (Formaldehidas NB 4%, Formaldehidas NB 10%), nuplaukite vandeniu ir nusausinkite nuosekliais alkoholio tirpalais. (Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 ir Histanol 100).
- Nuvalykite mėginį tarpine terpe; ksilene (BioClear) arba ksileno pakaitalu (BioClear New).
- Infiltruokite ir įdėkite mėginį į parafiną (BioWax Plus, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro).
- Parafino bloką supjaustykite 4-6 µm griežinėliais ir padėkite ant VitroGnost stiklelio.

B) Histologinių pjūvių dažymo procedūra

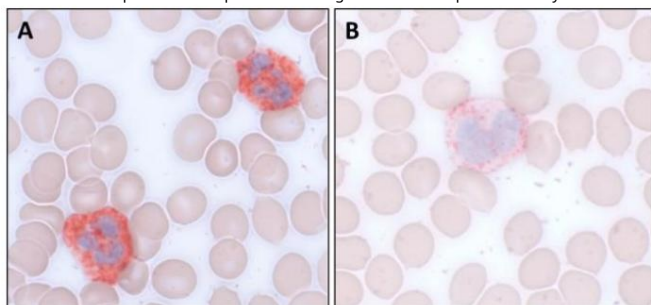
1. Deparafinuokite skyrių ksilene (BioClear) arba ksileno pakaitalu (BioClear New)	3 apsisėtimai, po 2 min
2. Rehidratuokite naudodami 100 % alkoholi (Histanol 100)	2 mainai, 5 ir 3 min
3. Rehidratuokite naudodami 95 % alkoholio (Histanol 95)	2 min
4. Rehidratuokite distiliuotame (demi) vandenyje.	2 min
5. Užtepkite dažymo tirpalą ant sekcijos (2 ml)	30 min
6. Atsargiai nuplaukite distiliuotu vandeniu	10 sek
7. Nudažykite sekciją LeukoGnost HEM reagentu. 8. Nuplaukite stiklėlį po vandeniu iš čiaupo 9.	5 min
Išdžiovinkite preparatą.	

Išdžiovinus preparatą, siekiant išsaugoti mėginio spalvą ir kokybę rekomenduojama už dengti stiklą su BioMount Aqua medium.

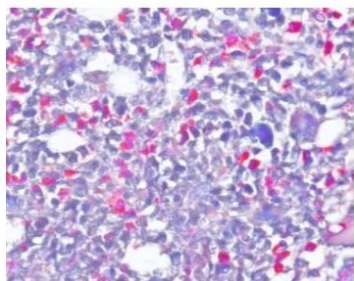
Rezultatas

Neutrofilai, promielocitai ir mieloblastinės leukemijos ląstelės – intensyvus raudonas granuliuotas citoplazmos dažymas.

Monocitai – retai pastebimas silpnas raudonas granuliuotas citoplazmos dažymas.



1 pav. Kraujo tepinėlis, nudažytas LeukoGnost SPE rinkiniu. Parodytas specifinis neutrofilų (A) ir monocitų (B) dažymas.



2 pav. Kaulų čiulpai (histologinis stiklis), nudažytas LeukoGnost SPE rinkiniu. Parodyta teigiama reakcija su mieloidinių ląstelių linijos ląstelėmis sergant ūmine mieloidine leukemija (AML). Didinimo lygis yra 200 kartų.

Mėginio paruošimas ir diagnostika

Mėginiams rinkti ir ruošti naudokite tik tinkamus instrumentus. Apdorokite pavyzdžius šiuolaikinėmis technologijomis ir aiškiai pažymėkite. Tvarkydami laikykitės gamintojo nurodymų. Siekiant išvengti klaidų, dažymo procedūrą ir diagnostiką turėtų atlikti tik įgalioti ir kvalifikuoti darbuotojai. Naudokite tik mikroskopą pagal medicinos diagnostikos laboratorijos standartus.

Darbo sauga ir aplinkos apsauga

Su gaminiu elkitės laikydamiesi saugos darbe ir aplinkos apsaugos nurodymų. Panaudoti tirpalai ir pasenę tirpalai turi būti šalinami kaip specialios atliekos pagal nacionalines gaires. Šioje procedūroje naudojamos cheminės medžiagos gali kelti pavojų žmonių sveikatai. Iširti audinių mėginiai yra potencialiai užkrečiami. Būtiną saugos priemonę žmonių sveikatai apsaugoti turėtų būti imamasi laikantis geros laboratorinės praktikos. Veikti pagal ženklinimus ir įspėjimus, išspausdintus ant gaminio etiketės, taip pat BioGnost medžiagų saugos duomenų lapą.

Sandėliavimas, stabilumas ir galiojimo laikas

LeukoGnost SPE rinkinio reagentus laikykite sandariai uždarytoje originalioje pakuotėje nuo +2 °C iki +8 °C temperatūroje. Neužšaldykite ir nelaikykite tiesioginių saulės spindulių. Gamintojo data ir galiojimo laikas yra atspausdinti ant gaminio etiketės.

Nuorodos

1. Carson, FL ir Hladik, C. (2009): Histology, 3rd ed., American Society for Clinical Pathology Press, Honkongas.
2. Lam KW, Li CY, Yam LT. Vienalaikis nespecifinės esterazės ir chloroacetato esterazės demonstravimas žmogaus kraujo ląstelėse. Stain Technol. 1985;60:169-72.
3. Shibata A, Bennett JM, Castoldi GL, Catovsky D, Flandrin G, Jaffe ES, Katayama I, Nanba K, Schmalzl F, Yam LT ir kt. Rekomenduojami metodai citologiniam hematologijos procedūrai. Tarptautinis hematologijos standartizacijos komitetas (ICSH). Clin Lab Hematol. 1985;7:55-74.

L2022 m. rugsėjo 26 d., SB/IŠP

	European Conformity		Storage temperature range		Number of tests in package		Product code
	Refer to supplied instructions		Keep away from heat and sunlight		Valid until		Lot number
	For in vitro diagnostic use only		Keep in dry place		Caution - fragile		Manufacturer

LEUKOGNOST SPE

IVD In vitro diagnostic medical device

CE

Kit for detection of specific esterase activity (Leder stain, chloroacetate esterase) in leukocytes

INSTRUCTIONS FOR USE

REF Product code: LKG-SPE (for at least 100 tests)

Introduction

LeukoGnost SPE kit contains reagents for cytochemical diagnosis of leukemia using bone marrow or whole blood smears. This method can be also used on formalin fixed and paraffin embedded material, especially on histological preparations of bone marrow.

The staining method is based on the ability of the cellular esterase to hydrolyze naphthol AS-D chloroacetate. The reaction releases free naphthol that binds to diazonium salts to give a red precipitate at the reaction site.

The kit is intended for individual testing of horizontally placed slides and it contains reagents for at least 100 tests for detecting acid phosphatase activity in leukocytes. The reagents are applied by dripping until the entire slide is covered (1-2 mL).

Product description

- **LEUKOGNOST SPE** - kit for detection of specific esterase activity (Leder stain, chloroacetate esterase) in leukocytes

The kit contains:	LKG-SPE (for 100 tests)	Storage temperature:
Reagent 1 (Sodium nitrite, solution)	NAN-OT-5 (5 mL)	2-8°C
Reagent 2 (Pararosaniline, solution)	PARA-OT-3 (3 mL)	2-8°C
Reagent 3 (SPE buffer)	FOP-OT-100 (2x100 mL)	2-8°C
Reagent 4 (SPE substrate)	NASD-OT-10 (10 mL)	2-8°C

Other reagents necessary for the staining method

- **LeukoGnost Fixative (LKF-500)** – fixative for use in cytochemical diagnosis of leukemia
- **LeukoGnost HEM (LKF-OT-500)** – hematoxylin for use in cytochemical diagnosis of leukemia

or

- **LeukoGnost PLUS (LKG-PLUS)** – set of additional reagents for LeukoGnost kits

Other sections and reagents that may be used with the staining procedure

- Water-based covering medium for microscope slides and mounting medium for cover glasses, such as BioGnost's **BioMount Aqua medium (BMA-30)**
- BioGnost's immersion oils, such as **Immersion oil (IU-30)** or **Immersion oil type A (IUA-30)**
- High-quality glass slides for use in histopathology and cytology, such as VitroGnost SUPER GRADE, VitroGnost COLOR or one of more than 30 models of BioGnost's VitroGnost glass slides
- Fixatives such as BioGnost's neutral buffered formaldehyde solutions: Formaldehyde NB 4%, Formaldehyde NB 10%
- Dehydrating/rehydrating agent, such as BioGnost's alcohol solutions: Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 and Histanol 100
- Clearing agents, such as BioClear xylene or a substitute, such as BioClear New agent on the aliphatic hydrocarbons basis
- Infiltration and fitting agent, such as BioGnost's granulated paraffin BioWax Plus, BioWax 56/68, BioWax Blue, BioWax Micro.

Preparing the solution for staining

Prepare the staining solution in the following way:

- step 1: mix Reagent 1 and Reagent 2 in a clean tube Let it set for 2 mins.
- step 2: add Reagent 3 to mixture of Reagents 1 and 2
- step 3: add Reagent 4 to the prepared mixture of Reagents from step 2

Modify the reagents' volume as necessary:

STEP	REAGENT	FOR 1 SECTION	FOR 12 SECTIONS	FOR 24 SECTIONS
step 1	reagent 1	50 µL (1 drop)	600 µL (12 drops)	1.2 mL (24 drops)
	reagent 2	25 µL (1 drop)	300 µL (12 drops)	600 µL (24 drops)
step 2	reagent 3	2 mL	24 mL	48 mL
step 3	reagent 4	100 µL (4 drops)	1.2 mL	2.4 mL

Preparing the section for staining

- Prepare the whole blood smear or bone marrow smear to be thin and dry (dry the smears for at least 30 mins). These sections must not be older than 3 days. Using anticoagulants is not recommended because it can inhibit the enzyme reaction.
- Fix the section the following way:

1.	Fix the smear by applying LeukoGnost Fixative (1-2 mL) onto the slide	1-3 minutes
2.	Rinse the slide in distilled water	10 seconds
3.	Dry the preparation	

- Sections prepared and fixed in this manner can be stored at 2 to 8 °C and used for 3 days at most.

NOTE

Apply the reagent so it completely covers the slide.

Prepare fresh staining solution priori to each staining. The prepared solution must be used within 45 minutes.

A) Blood smears and bone marrow smears staining procedure

1.	Apply staining solution (1-2 mL) onto the slide	30 min
2.	Rinse the slide in distilled water thoroughly	10 seconds
3.	Stain the slide using LeukoGnost HEM reagent	5 min

4.	Rinse the slide under tap water	5 min
5.	Dry the preparation	

After drying the preparation, it is recommended to mount cover glass using BioMount Aqua medium to preserve the color and quality of the sample.

Preparing the histology sections for staining

- Fix the sample (Formaldehyde NB 4%, Formaldehyde NB 10%), rinse with water and dehydrate through series of ascending alcohol solutions (Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 and Histanol 100).
- Clear the sample with intermedium; in xylene (BioClear) or in a xylene substitute (BioClear New).
- Infiltrate and fit the sample in paraffin (BioWax Plus, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro).
- Cut the paraffin block to 4-6 μm slices and place them on a VitroGnost glass slide.

B) Histology sections staining procedure

1.	Deparaffinize the section in xylene (BioClear) or in a xylene substitute (BioClear New)	3 exchanges, 2 min each
2.	Rehydrate using 100% alcohol (Histanol 100)	2 exchanges, 5 and 3 min
3.	Rehydrate using 95% alcohol (Histanol 95)	2 min
4.	Rehydrate in distilled (demi) water	2 min
5.	Apply the staining solution on the section (2 mL)	30 min
6.	Carefully rinse in distilled water	10 sec
7.	Stain the section with LeukoGnost HEM reagent	5 min
8.	Rinse the slide under tap water	5 min
9.	Dry the preparation	

After drying the preparation, it is recommended to mount cover glass using BioMount Aqua medium to preserve the color and quality of the sample.

Result

Neutrophils, promyelocytes and myeloblastic leukemia cells - intense red granular staining of the cytoplasm.

Monocytes - rarely show faint red granular staining of the cytoplasm.

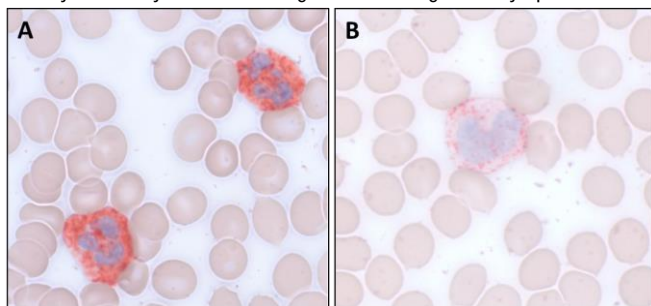


Figure 1. Blood smears stained with LeukoGnost SPE kit. Specific staining of neutrophils (A) and monocyte (B) are shown.

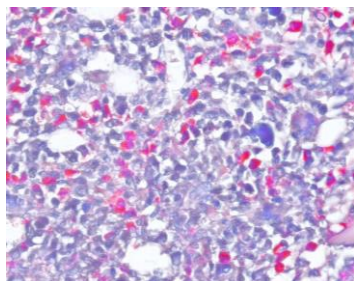


Figure 2. Bone marrow (histological slide) stained with LeukoGnost SPE kit. Positive reaction with cells of the myeloid cell line in acute myeloid leukemia (AML) is shown. Magnification level is 200x.

Preparing the sample and diagnostics

Use only appropriate instruments for collecting and preparing the samples. Process the samples with modern technology and mark them clearly. Follow the manufacturer's instructions for handling. In order to avoid mistakes, the staining procedure and diagnostics should only be conducted by authorized and qualified personnel. Use only microscope according to standards of the medical diagnostic laboratory.

Safety at work and environmental protection

Handle the product in accordance with safety at work and environmental protection guidelines. Used solutions and out of date solutions should be disposed of as special waste in accordance with national guidelines. Chemicals used in this procedure could pose danger to human health. Tested tissue specimens are potentially infectious. Necessary safety measures for protecting human health should be taken in accordance with good laboratory practice. Act in accordance with signs and warnings notices printed on the product's label, as well as in BioGnost's material safety data sheet.

Storing, stability and expiry date

Store LeukoGnost SPE kit's reagents in a tightly closed original packaging at temperature between +2 °C and +8 °C. Do not freeze and avoid exposing to direct sunlight. Date of manufacture and expiry date are printed on the product's label.

References

- Carson, F.L. et Hladik, C. (2009): Histology, 3rd ed., American Society for Clinical Pathology Press, Hong Kong.
- Lam KW, Li CY, Yam LT. Simultaneous demonstration of nonspecific esterase and chloroacetate esterase in human blood cells. Stain Technol. 1985;60:169-72.
- Shibata A, Bennett JM, Castoldi GL, Catovsky D, Flandrin G, Jaffe ES, Katayama I, Nanba K, Schmalzl F, Yam LT, et al. Recommended methods for cytological procedures in haematology. International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Clin Lab Haematol. 1985;7:55-74.

LKG-SPE, V8-EN2, 26 September 2022, SB/ISP

	European Conformity		Storage temperature range		Number of tests in package		Product code
	Refer to supplied instructions		Keep away from heat and sunlight		Valid until		Lot number
	For in vitro diagnostic use only		Keep in dry place		Caution - fragile		Manufacturer