

Sigma-Aldrich®

Instructions for Use

Leukocyte α-Naphthyl Acetate (Non-Specific Esterase) and Leukocyte Naphthol AS-D Chloroacetate (Specific Esterase) Kit

Procedure No. 91



Intended Use

Sigma-Aldrich Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase and α-Naphthyl Acetate Esterase kits are intended as a general laboratory use histological stain. Naphthol AS-D chloroacetate esterase and α-naphthyl acetate esterase reagents are for professional "In Vitro Diagnostic Use" only. This manual, qualitative, histochemical procedure demonstrates naphthol AS-D chloroacetate esterase and α-naphthyl acetate esterase activity in leukocytes of human blood, bone marrow films, or tissue touch preparations. Histological visualization of leucocyte cellular esterases is a unique technique currently commonly used in medicine.

Cellular esterases are ubiquitous, apparently representing a series of different enzymes acting upon select substrates. Under defined reaction conditions, it may be possible to determine hemopoietic cell types, using specific esterase substrates. The described methods provide hematologists and hematopathologists means of distinguishing granulocytes from monocytes.¹⁻⁷

To perform the test, blood, bone marrow films or tissue touch preparations are incubated with either naphthol AS-D chloroacetate (NCAE) or α-naphthyl acetate (NAE) in the presence of freshly formed diazonium salt. Enzymatic hydrolysis of ester linkages liberates free naphthol compounds. These couple with the diazonium salt, forming highly colored deposits at sites of enzyme activity.

Most recent procedures, including those provided by Sigma-Aldrich, employ stable diazonium salts. These are formed by reacting an arylamine with sodium nitrite in an acid medium.⁸ The resulting diazonium chloride (usually unstable) can then be treated with compounds such as zinc chloride, zinc sulfate or naphthalene-1-6-disulfonate, forming stable salts. These stabilizers may exert marked inhibition on some enzymatic systems, whereas the diazonium chlorides are less inhibitory.⁹ For this reason, Sigma-Aldrich now provides stable solutions for Fast Red Violet LB Base, Fast Blue BB Base and Sodium Nitrite for esterase cytochemistry. To further simplify these methods, stable solutions of Naphthol AS-D Chloroacetate and α-Naphthyl Acetate are included. The availability of these stable solutions allows the customer to adjust working reagent volumes according to needs, eliminating waste.

Reagents

Naphthol AS-D Chloroacetate Solution (Cat. No. 911-10ML)

Naphthol AS-D chloroacetate, 8 mg/mL, and stabilizer. Warning. Causes eye irritation. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Fast Red Violet LB Base Solution (Cat. No. 912-10ML)

Fast red violet LB base, 15 mg/mL, in 0.4 mol/L hydrochloric acid with stabilizer. Danger. Causes severe skin burns and eye damage. Wear protective gloves/eye protection/face protection.

TRIZMAL™ 6.3 Concentrate (Cat. No. 913-50ML)

TRIZMA® maleate, 1 mol/L, with surfactant. pH 6.3 ± 0.15 at 25°C. Danger. Causes skin irritation. May cause allergic skin reaction. Causes serious eye damage. Wear protective gloves/eye protection/face protection.

Sodium Nitrite Solution (Cat. No. 914-10ML)

Sodium nitrite, 0.1 mol/L

Citrate Solution (Cat. No. 915-50ML)

Citric acid, 18 mmol/L, sodium citrate, 9 mmol/L, sodium chloride, 12 mmol/L, with surfactant. pH 3.6 ± 0.1 at 25°C

α-Naphthyl Acetate Solution (Cat. No. 916-10ML)

α-Naphthyl acetate, 12.5 mg/mL, in methanol solution with stabilizers. Danger. Flammable liquid and vapour. Toxic if swallowed. Harmful in contact with skin or if inhaled. Causes mild skin irritation. Causes serious eye irritation. Causes damage to organs.

Fast Blue BB Base Solution (Cat. No. 917-10ML)

Fast blue BB base, 15 mg/mL, C.I. 37175 in 0.4 mol/L hydrochloric acid with stabilizers. Warning. Harmful if swallowed. Causes mild skin irritation. Causes serious eye irritation. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.

TRIZMAL™ 7.6 Concentrate (Cat. No. 918-50ML)

TRIZMA® maleate, 1 mol/L, with surfactant. pH 7.6 ± 0.15 at 25°C. Danger. Causes skin irritation. Causes serious eye damage. May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. May cause respiratory irritation. Harmful to aquatic life.

Hematoxylin Solution Gill No. 3 (Cat. No. GHS3-50ML)

Certified hematoxylin, 6.0 g/L, C.I. 75290, sodium iodate, 0.6 g/L, and aluminum sulfate, 52.8 g/L, with stabilizers. Danger. Harmful if swallowed. Causes serious eye damage. Wear protective gloves/eye protection/face protection.

Sodium Fluoride Solution (Cat. No. 919-25ML)

Sodium fluoride, 20 g/L. Warning. Harmful if swallowed. Causes mild skin irritation.

Special Materials Required but Not Provided

- Acetone, ACS Reagent
- Formaldehyde, 37%, ACS
- Sodium Fluoride Solution, Cat. No. 919-25ML (Required for α-Naphthyl Acetate Esterase with Fluoride Inhibition Procedure.)

Storage and Stability

Store Hematoxylin Solution Gill No. 3 at room temperature (18–26°C) protected from light. Store other reagents in refrigerator (2–8°C).

TRIZMAL™ 6.3 Concentrate, TRIZMAL™ 7.6 Concentrate and Citrate Solution are suitable for use in the absence of microbial growth. Other reagents are stable until expiration date shown on the labels.

Deterioration

Discard TRIZMAL™ Concentrate and Citrate Solution if microbial growth is evident. Discard Hematoxylin Solution Gill No. 3 if solution turns brown (over-oxidized from air) or purple (loss of acidity).

Preparation

Warm all reagents to room temperature (18–26°C) before use. Esterase reagents are provided ready for use.

Citrate-Acetone-Formaldehyde Fixative: To 25 mL Citrate Solution, add 65 mL Acetone and 8 mL 37% Formaldehyde. Place in glass bottle and cap tightly. Store in refrigerator (2–8°C). Bring to room temperature (18–26°C) prior to use. Stable up to 4 weeks if stored tightly capped in refrigerator.

Precautions

The IVDs included in these kits are intended for in vitro diagnostic use in a clinical laboratory environment. These IVDs are for professional use by qualified personnel only. Sigma-Aldrich IVDs may be operated by laboratory personnel who are trained to handle human specimens that can be infectious, use microscopes and other laboratory equipment and have color perception and visual acuity to distinguish colors and other objects under a microscope.

Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. Dispose of waste observing all local, state, provincial or national regulations.

Procedure

Specimen Collection

No known test method can offer complete assurance that blood samples or tissue will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives or tissue specimens should be considered potentially infectious.

Blood, bone marrow films, tissue touch preparation and cytocentrifuge preparations may be used with both α-naphthyl acetate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase. Either EDTA or heparin will serve as an anticoagulant.⁹ Frozen and paraffin embedded tissues may be used with naphthol AS-D chloroacetate esterase. α-Naphthyl acetate esterase may be used successfully on frozen tissue sections.¹⁰ Blood or bone marrow films may be stored fixed at room temperature (18–26°C) for several weeks or unfixed for several days without appreciable change in activity.^{4,9} Do not ship whole blood for assay at other laboratories. Send fixed or unfixed slides. Slides should be kept cool during transit. Allow films to dry at least 1 hour prior to fixation.

Limitations of the Procedure

The described procedures are performed at 37°C. If reagents are not at this temperature, weak or negative reactions may be obtained. It is recommended that temperatures be checked with an accurate thermometer. Controlled temperature water baths are more efficient than warm air incubators and should be used for enzyme cytochemical methods. Heat transfer through glass is more rapid than through plastic, thus, glass Coplin jars should be employed.

Many enzyme systems are sensitive to minute traces of detergent. Washing glassware with dilute bleach followed by rinsing in copious quantities of deionized water will prevent detergent effect upon cellular enzymes.

The fixative system described in the "Reagents" section contains formaldehyde. If fixative is not completely removed by vigorous rinsing, any amount of aldehyde, either concentrated on air-dried slides or trace amounts from wet slides, added to the incubation system may result in enzyme inhibition. To prevent loss of blood film during the rinse process, direct the water stream onto the slide above the feather edge. Rinse both sides of the slide.

Results are based on a certain degree of subjective interpretation. Individual laboratories should establish their own normal ranges.

Notes

Users of Sigma Kits 390A and 91C should exercise caution when using TRIZMA® Buffer Concentrates Catalog Nos. 913 and 903C as they are not interchangeable. Use of incorrect buffer will result in a negative reaction.

Procedure

The described procedures are performed at 37°C.

Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase Procedure

1. Prewarm sufficient deionized water for substrate use to 37°C. Check temperature before use.
2. Immediately prior to fixation, add 1 mL Sodium Nitrite Solution to 1 mL Fast Red Violet LB Base Solution in a test tube. Mix gently by inversion and allow to stand 2 minutes. Active evolution of gas bubbles should be avoided.
3. Add solution from Step 2 to 40 mL prewarmed deionized water from Step 1.
4. Add 5 mL TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate. (See "Note")
5. Add 1 mL Naphthol AS-D Chloroacetate Solution. The solution should turn red. Mix well and pour into Coplin jar.
6. Bring Citrate-Acetone-Formaldehyde (CAF) Solution to room temperature (18–26°C). Fix slides by immersing in CAF solution for 30 seconds.
7. Rinse slides thoroughly in running deionized water for 45–60 seconds, then place in solution from Step 5. Do not allow slides to dry.
8. Incubate for 15 minutes, at 37°C protected from light.
9. After 15 minutes, remove slides and rinse thoroughly in deionized water for at least 2 minutes.
10. Counterstain 2 minutes in Hematoxylin Solution, Gill No. 3.
11. Rinse in tap water and air dry.
12. Evaluate microscopically. If coverslipping is required use only an aqueous mounting media.

Notes

- For use with Columbia jars, divide reagent volumes by 5.
- If substrate (See Step 5) appears turbid bring to room temperature (18–26°C) and mix well.
- If slides have been prefixed and stored, skip fixation (Steps 6 and 7) and begin staining of dry, prefixed slides at Step 8.

α-Naphthyl Acetate Esterase Procedure

1. Prewarm sufficient deionized water for substrate use to 37°C. Check temperature before use.
2. Immediately prior to fixation, add 1 mL Sodium Nitrite Solution to 1 mL Fast Blue BB Base Solution in a test tube. Mix by inversion and allow to stand at least 2 minutes. The color will change from dirty brown to deep yellow. Active evolution of gas bubbles should be avoided.
3. Add solution from Step 2 to 40 mL prewarmed deionized water from Step 1.
4. Add 5 mL TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate.
5. Add 1 mL α-Naphthyl Acetate Solution. The solution should turn greenish. Mix well and pour into Coplin jar.
6. Bring Citrate-Acetone-Formaldehyde (CAF) Solution to room temperature (18–26°C). Fix slides by immersing in CAF solution for 30 seconds. Agitate slides vigorously for the last 5 seconds.
7. Rinse slides thoroughly in running deionized water for 45–60 seconds, then place in solution from Step 5. Do not allow slides to dry.
8. Incubate for 30 minutes at 37°C protected from light.
9. After 30 minutes, remove slides and rinse thoroughly for at least 2 minutes in running deionized water.
10. Counterstain 2 minutes in Hematoxylin Solution, Gill No. 3.
11. Rinse in tap water and air dry.
12. Evaluate microscopically. If coverslipping is required use only an aqueous mounting media.

Notes

- For use with Columbia jars, divide reagent volumes by 5.
- If substrate (See Step 5) appears turbid bring to room temperature (18–26°C) and mix well.
- If slides have been prefixed and stored, skip fixation (Steps 6 and 7) and begin staining of dry, prefixed slides at Step 8.

Double Staining Esterase Procedure

1. Perform α-Naphthyl Acetate Esterase test as described in Procedure. Do not counterstain.
2. Rinse slide 5 minutes in deionized water.
3. Perform Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase test as described in Procedure Steps 1-12. Omit Step 6.

Note

Fast Blue BB Base Solution may be substituted for Fast Red Violet LB Base Solution if blue granulation is preferred for Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase.

α-Naphthyl Acetate Esterase with Fluoride Inhibition Procedure

Although α-naphthyl acetate esterase is found primarily in cells of monocytic lineage when performed as described, it should be recognized that megakaryocytes and erythroid precursors are positive for this enzyme.¹¹ Lymphocytes and some mature granulocytes also show occasional positivity.⁴ To differentiate these cells conclusively from monocytes, sodium fluoride is incorporated with the incubation system. The monocyte enzyme is inactivated in the presence of this compound.¹² The following procedure may be used to perform the fluoride inhibition test.

1. To 2 mL Fast Blue BB Base Solution add 2 mL Sodium Nitrite Solution. Mix gently by inversion. Allow to stand 2 minutes.
2. Label 2 beakers A and B, and add the following:

	Beaker A	Beaker B
Prewarmed 37°C deionized water	40 mL	40 mL
Diazotized Fast Blue BB from Step 1	2 mL	2 mL
TRIZMAL™ 7.6 Concentrate	5 mL	5 mL
α-Naphthyl Acetate Solution	1 mL	1 mL
Sodium Fluoride Solution	-	1 mL

3. Mix well and pour into Coplin jars labeled A and B.
4. Proceed as described in Steps 6-12 of α-Naphthyl Acetate Esterase Procedure.

Performance Characteristics

Method of Scoring

Scan the film and select a thin area with few erythrocytes. Sites of Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase activity will appear as bright red granulation, α-Naphthyl Acetate Esterase as black granulation. Rate from 0 to 4+ on the basis of quantity and intensity of individual dyes within the cytoplasm of the respective cell types. Characteristics of scoring are based on somewhat subjective interpretation. A suggested scoring format is presented in Table 1. Conclusions center on relative presence or absence of staining.

Table 1. Characteristics of Scoring

Cell Rating	Staining Intensity	Interpretation
0+	None	–
1+	Faint to Moderate	±
2+	Moderate to Strong	+
3+	Strong	+
4+	Brilliant	+

Expected Observations

Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase

(Fast Red Violet LB) - Enzyme is usually considered specific for cells of granulocytic lineage. Sites of activity show bright red granulation. Activity is weak or absent in monocytes and lymphocytes.

α-Naphthyl Acetate Esterase

(Fast Blue BB) - Enzyme is detected primarily in monocytes, macrophages and histiocytes, and is virtually absent in granulocytes. Monocytes should show black granulation. Lymphocytes may occasionally exhibit enzyme activity.

Double Staining Esterase

Specimens taken through the double staining procedure will demonstrate the granulocytes with red granulation and monocytes with black granulation.

α-Naphthyl Acetate Esterase with Fluoride Inhibition

All cells of monocytic lineage will be negative for enzyme activity, with the exception of differentiated histiocytes or specialized macrophages in tissue which may also be resistant to sodium fluoride.¹⁰

Quality Control

The reagent system should be monitored by the use of positive and negative control slides.

Positive control slides may be prepared from specific cell lines known to be positive.

Alternately, anti-coagulated blood from normal specimens (preferably with increased monocyte count if using α-naphthyl acetate esterase procedure) may also be used; however, they will provide less intense staining and will have fewer positive cells.

Known negative patient slides may be used as a negative control. If unavailable, staining a specimen in an incubation mixture with the substrate omitted will give the desired results. However, use of the former is highly recommended.

If observed results vary from expected results, please contact Sigma-Aldrich Technical Service for assistance.

Analytical Performance Characteristics

The analytical performance results for the given tests conducted on all target structures, confirm 100% sensitivity, specificity, and repeatability.

Cat. No	Product Description	Target	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity
911	Naphthol AS-D Chloroacetate Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
912	Fast Red Violet LB Base Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
913	TRIZMAL™ 6.3 Concentrate	Osmolality	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
		pH	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
914	Sodium Nitrate Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
915	Citrate Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
916	α-Naphthyl Acetate Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
917	Fast Blue BB Base Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
918	TRIZMAL™ 7.6 Concentrate	Osmolality	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
		pH	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
919	Sodium Fluoride Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
GHS3	Hematoxylin Solution, Gill No. 3	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3

Warnings and Hazards

Refer to Safety Data Sheet and product labeling for any updated risk, hazard or safety information.

91A:



H226 Flammable liquid and vapor.

H290 May be corrosive to metals.

H301 Toxic if swallowed.

H312 + H332 Harmful in contact with skin or if inhaled.

H319 Causes serious eye irritation.

H370 Causes damage to organs (Eyes, Central nervous system).

H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

P210 Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.

P273 Avoid release to the environment.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

P301 + P310 IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER/ doctor.

P303 + P361 + P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.

P304 + P340 + P312 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER/ doctor if you feel unwell.

91C:



- H290 May be corrosive to metals.
- H302 Harmful if swallowed.
- H315 Causes skin irritation.
- H317 May cause an allergic skin reaction.
- H318 Causes serious eye damage.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H360FD May damage fertility. May damage the unborn child.
- H373 May cause damage to organs (Kidney) through prolonged or repeated exposure if swallowed.
- P202 Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
- P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
- P301 + P312 IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor if you feel unwell.
- P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
- P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
- P308 + P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention.

If during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

Symbol Definitions

Symbols as defined in EN ISO 15223-1:2021

	Manufacturer		Catalogue Number
	Consult Instructions for Use		Batch Code
	Authorized Representative in the European Community/ European Union		European Union Declaration of Conformity (defined in IVDR 2017/746)
	Use-by Date		In vitro diagnostic medical device
	Temperature Limit		Caution
	Date of Manufacture		Importer
	Indicates the Authorised Representative in Switzerland		

References

1. Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Contact Information

To place an order, please visit our web site at [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). For Technical Service, please visit the tech service page on our web site at [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revision History

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Transferred to new template with current branding. Specified for professional use in intended use and precautions. Revised intended use to align with IVDR guidelines. Updated Material Safety Data Sheet to Safety Data Sheet. Updated contact information. Removed instruction to follow CLSI for specimen collection. Removed EN 980 and changed to EN ISO 15223-1:2021 for symbols. Added adverse event contact information. Updated literature references. Added a revision history table. Added Warnings and Hazards. Added CH-REP information.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

The Initial M and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Anweisungen für den Gebrauch

Leukozyten α -Naphthylacetat (unspezifische Esterase) und Leukozyten-Naphthol-AS-D-Chloracetat (spezifische Esterase) – Kit

Verfahren Nr. 91



Verwendungszweck

Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase- und α -Naphthylacetat-Esterase-Kits von Sigma-Aldrich sind als allgemeine histologische Färbemittel für den Laborgebrauch bestimmt. Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase- und α -Naphthylacetat-Esterase-Reagenzien sind nur für die professionelle „In-vitro-Diagnostik“ bestimmt. Dieses manuelle, qualitative, histochemische Verfahren weist die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase- und α -Naphthylacetat-Esterase-Aktivität in Leukozyten aus menschlichem Blut, Knochenmarkausstrichen oder Gewebepuffpräparaten nach. Die histologische Visualisierung der zellulären Esterasen ermöglicht die Identifizierung von Leukozyten, die derzeit in der Medizin häufig eingesetzt wird.

Zelluläre Esterasen finden sich ubiquitär und repräsentieren anscheinend eine Reihe verschiedener Enzyme, die mit bestimmten Substraten interagieren. Unter definierten Reaktionsbedingungen ist es möglich, mit spezifischen Esterase-Substraten hämatopoetische Zelltypen zu bestimmen. Die beschriebenen Methoden ermöglichen Hämatologen und Hämatopathologen die Unterscheidung von Granulozyten und Monozyten.¹⁻⁷

Zur Durchführung des Tests werden Blut, Knochenmarkausstriche oder Gewebepuffpräparate in Gegenwart eines frisch gebildeten Diazoniumsalzes entweder in Naphthol-AS-D-Chloracetat (NCAE) oder α -Naphthylacetat (NAE) inkubiert. Die enzymatische Hydrolyse der Esterbindungen führt zu freien Naphtholverbindungen. Diese verbinden sich mit dem Diazoniumsalz und bilden intensiv gefärbte Rückstände in Bereichen mit Enzymaktivität.

Bei den meisten aktuellen Verfahren, auch bei den Verfahren von Sigma-Aldrich, werden stabile Diazoniumsalze verwendet. Diese werden durch Reaktion eines Arylamins mit Natriumnitrit in einem sauren Medium gebildet.⁸ Das daraus entstandene Diazoniumchlorid (gewöhnlich instabil) kann anschließend mit Verbindungen wie Zinkchlorid, Zinksulfat oder Naphthalin-1,6-disulfonat behandelt werden, die stabile Salze bilden. Diese Stabilisatoren können einige Enzymsysteme erheblich hemmen. Diazoniumchloride wirken hingegen weniger hemmend.⁸ Aus diesem Grund bietet Sigma-Aldrich jetzt für die Esterase-Zytochemie stabile Lösungen für Echtrötviolett LB Base, Echtblau BB Base und Natriumnitrit an. Zur weiteren Vereinfachung dieser Methoden sind stabile Lösungen von Naphthol-AS-D-Chloracetat und α -Naphthylacetat enthalten. Die Verfügbarkeit dieser stabilen Lösungen ermöglicht es Kunden, die Volumina der Arbeitsreagenzien nach Bedarf anzupassen und so Abfall zu vermeiden.

Reagenzien

Naphthol-AS-D-Chloracetat-Lösung (Kat.-Nr. 911-10ML)

Naphthol AS-D-Chloracetat, 8 mg/ml und Stabilisator. Warnung. Verursacht Augenreizungen. WENN IM AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.

Echtrötviolett LB Basislösung (Kat.-Nr. 912-10ML)

Echtrötviolett LB Base, 15 mg/ml, in 0,4 mol/l Salzsäure mit Stabilisator. Gefahr. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und Augenschäden. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

TRIZMAL™ 6.3 Konzentrat (Kat.-Nr. 913-50ML)

TRIZMA® Maleat, 1 mol/l, mit Tensid. pH-Wert 6,3 $\pm$ 0,15 bei 25 °C. Gefahr. Verursacht Hautreizungen. Kann allergische Reaktionen der Haut verursachen. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

Natriumnitrit-Lösung (Kat.-Nr. 914-10ML)

Natriumnitrit, 0,1 mol/l

Citratlösung (Kat.-Nr. 915-50ML)

Zitronensäure, 18 mmol/l, Natriumcitrat, 9 mmol/l, Natriumchlorid, 12 mmol/l mit Tensid. pH-Wert 3,6 $\pm$ 0,1 bei 25 °C

α -Naphthylacetat-Lösung (Kat.-Nr. 916-10ML)

α -Naphthylacetat, 12,5 mg/ml, in Methanol-Lösung mit Stabilisatoren. Gefahr. Entzündliche Flüssigkeit und Dampf. Giftig bei Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Kontakt mit der Haut oder beim Einatmen. Verursacht leichte Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizungen. Verursacht Schäden an den Organen.

Echtblau BB Basislösung (Kat.-Nr. 917-10ML)

Echtblau BB Base, 15 mg/ml, C.I. 37175 in 0,4 mol/l Salzsäure mit Stabilisatoren. Warnung. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Verursacht leichte Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizungen. WENN IM AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen.

TRIZMAL™ 7.6 Konzentrat (Kat.-Nr. 918-50ML)

TRIZMA® Maleat, 1 mol/l, mit Tensid. pH-Wert 7,6 $\pm$ 0,15 bei 25 °C. Gefahr. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Kann bei Einatmung allergische oder asthmatische Symptome oder Atembeschwerden hervorrufen. Kann die Atemwege reizen. Schädlich für Wasserorganismen.

Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 3 (Kat.-Nr. GHS3-50ML)

Zertifiziertes Hämatoxylin, 6,0 g/l, C.I. 75290, Natriumiodat, 0,6 g/l und Aluminiumsulfat, 52,8 g/l mit Stabilisatoren. Gefahr. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

Natriumfluorid-Lösung (Kat.-Nr. 919-25ML)

Natriumfluorid, 20 g/l. Warnung. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Verursacht leichte Hautreizungen.

Spezielle Materialien, die erforderlich sind, aber nicht zur Verfügung gestellt werden

- Aceton, ACS-Reagenz
- Formaldehyd, 37 %, ACS
- Natriumfluorid-Lösung, Kat.-Nr. 919-25ML (Für das α -Naphthylacetat-Esterase-Verfahren mit Fluorid-Inhibition benötigt).

Lagerung und Stabilität

Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 3 bei Raumtemperatur (18–26 °C) und vor Licht geschützt lagern. Die übrigen Reagenzien im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C).

TRIZMAL™ 6.3 Konzentrat, TRIZMAL™ 7.6 Konzentrat und Citratlösung können bei Abwesenheit von mikrobiellem Wachstum verwendet werden. Die übrigen Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Zerfall

TRIZMAL™ Konzentrat und Citratlösung bei offensichtlichem mikrobiellem Wachstum entsorgen. Die Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 3 entsorgen, wenn sich die Lösung braun (Überoxidation durch Luft) oder violett (Säureverlust) färbt.

Vorbereitung

Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–26 °C) erwärmen. Die Esterase-Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixiermittel: 25 ml Citratlösung mit 65 ml Aceton und 8 ml 37%iger Formaldehydlösung versetzen. In eine Glasflasche füllen und fest verschließen. Im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen. Bis zu 4 Wochen stabil, wenn die Lagerung fest verschlossen im Kühlschrank erfolgt.

Vorsichtsmaßnahmen

Die in diesen Kits enthaltenen IVDs sind für die In-vitro-Diagnostik in einer klinischen Laborumgebung bestimmt. Diese IVDs sind nur für den professionellen Gebrauch durch qualifiziertes Personal bestimmt. Die IVDs von Sigma-Aldrich können von Labpersonal bedient werden, das im Umgang mit menschlichen Proben, die infektiös sein können, geschult ist, Mikroskope und andere Laborgeräte bedienen kann und über eine Farbwahrnehmung und Sehschärfe verfügt, um Farben und andere Objekte unter dem Mikroskop zu unterscheiden.

Beim Umgang mit Laborreagenzien sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Entsorgen Sie den Abfall unter Einhaltung aller örtlichen, staatlichen, regionalen oder nationalen Vorschriften.

Verfahren

Probenentnahme

Keine bekannte Testmethode kann vollständige Sicherheit bieten, dass Blutproben oder Gewebe keine Infektion übertragen. Daher sollten alle Blutderivate oder Gewebeproben als potenziell infektiös betrachtet werden.

Blut, Knochenmarkausstriche, Gewebepuffpräparate und Zytocentrifugenpräparate können sowohl mit α -Naphthylacetat-Esterase als auch mit Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase verwendet werden. Als Antikoagulantien können EDTA und Heparin verwendet werden.⁹ Gefrorene und in Paraffin eingebettete Gewebe können mit Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase verwendet werden. α -Naphthylacetat-Esterase kann bei gefrorenen Gewebeschritten eingesetzt werden.¹⁰ Blut- und Knochenmarkausstriche können mehrere Wochen lang fixiert bei Raumtemperatur (18–26 °C) bzw. mehrere Tage lang unfixiert aufbewahrt werden, ohne dass eine bedeutende Veränderung der Aktivität eintritt.^{4,5} Vollblutproben dürfen nicht zur Untersuchung an andere Labors geschickt werden. Stattdessen fixierte oder nicht fixierte Objektträger senden. Die Objektträger sollten während des Transports kühl gelagert werden. Ausstriche vor dem Fixieren mindestens 1 Stunde trocknen lassen.

Einschränkungen des Verfahrens

Die beschriebenen Verfahren werden bei 37 °C durchgeführt. Wenn die Reagenzien nicht auf dieser Temperatur eingestellt sind, können die Reaktionen schwach oder negativ ausfallen. Es wird empfohlen, die Temperaturen mit einem präzisen Thermometer zu überprüfen. Wasserbäder mit kontrollierter Temperatur sind effizienter als Wärmeluftinkubatoren und sollten für enzymzytochemische Methoden verwendet werden. Der Wärmetransport erfolgt durch Glas schneller als durch Kunststoff, daher sollten Coplin-Färbetröge aus Glas verwendet werden.

Viele Enzymsysteme reagieren bereits auf kleinste Spuren von Reinigungsmittel empfindlich. Das Auswaschen von Glasgefäßen mit verdünntem Bleichmittel und das anschließende Spülen mit reichlich entionisiertem Wasser beugt der Beeinträchtigung der zellulären Enzyme durch Reinigungsmittel vor.

Das im Abschnitt „Reagenzien“ beschriebene Fixiersystem enthält Formaldehyd. Wird das Fixiermittel nicht vollständig durch gründliches Spülen entfernt, können etwaige Mengen an Aldehyd, entweder in konzentrierter Form auf luftgetrockneten Objektträgern oder in Spuren auf feuchten Objektträgern, die in das Inkubationssystem eingebracht werden, zu einer Hemmung der Enzyme führen. Um einen Verlust des Blutausstrichs während des Spülvorgangs zu vermeiden, ist der Wasserstrahl oberhalb des Federrandes auf den Objektträger zu richten. Beide Seiten des Objektträgers abspülen.

Die Ergebnisse beruhen auf einem gewissen Maß an subjektiver Interpretation. Labors sollten ihre jeweils eigenen Normalbereiche festlegen.

Anmerkungen

Benutzer der Kits 390A und 91C von Sigma sollten bei der Verwendung der TRIZMA® Pufferkonzentrate mit den Katalognummern 913 und 903C mit Vorsicht vorgehen, da diese nicht untereinander austauschbar sind. Die Verwendung des falschen Puffers führt zu einer negativen Reaktion.

Verfahren

Die beschriebenen Verfahren werden bei 37 °C durchgeführt.

Verfahren mit Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

1. Eine ausreichende Menge entionisiertes Wasser für die Verwendung als Substrat auf 37 °C erwärmen. Temperatur vor Gebrauch prüfen.
2. Unmittelbar vor der Fixierung 1 ml Natriumnitritlösung zu 1 ml Echtrötviolett LB-Basislösung in ein Reagenzglas geben. Vorsichtig durch Schwenken mischen und 2 Minuten stehen lassen. Die aktive Bildung von Gasblasen sollte vermieden werden.
3. Die Lösung aus Schritt 2 zu 40 ml vorgewärmtem entionisiertem Wasser aus Schritt 1 geben.
4. 5 ml TRIZMAL™ 6.3 Pufferkonzentrat hinzufügen. (Siehe „Hinweis“)
5. 1 ml Naphthol-AS-D-Chloracetatlösung hinzufügen. Die Lösung sollte sich rot färben. Gut mischen und in einen Coplin-Färbetrog geben.
6. Die Citrat-Aceton-Formaldehyd (CAF)-Lösung auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen. Die Objektträger durch Eintauchen in die CAF für 30 Sekunden fixieren.
7. Die Objektträger 45 bis 60 Sekunden lang unter fließendem entionisiertem Wasser abspülen und dann in die Lösung aus Schritt 5 geben. Die Objektträger nicht trocknen lassen.

- Für 15 Minuten bei 37 °C und vor Licht geschützt inkubieren.
- Die Objektträger nach 15 Minuten herausnehmen und mindestens 2 Minuten lang gründlich mit entionisiertem Wasser abspülen.
- 2 Minuten in Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, gegenfärben.
- Mit Leitungswasser abspülen und trocknen.
- Mikroskopisch untersuchen. Wenn das Abdecken mit einem Deckglas erforderlich ist, darf nur ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden.

Anmerkungen

- Bei Verwendung von Columbia-Färbetrögen das Reagenzvolumen durch 5 teilen.
- Wenn das Substrat (siehe Schritt 5) eine Trübung aufweist, es auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen und gut mischen.
- Bei bereits vorfixierten und gelagerten Objektträgern die Fixierung (Schritte 6 und 7) überspringen und mit der Färbung der trockenen, vorfixierten Objektträger mit Schritt 8 beginnen.

Verfahren für α-Naphthylacetatesterase

- Eine ausreichende Menge entionisiertes Wasser für die Verwendung als Substrat auf 37 °C erwärmen. Temperatur vor Gebrauch prüfen.
- Unmittelbar vor der Fixierung 1 ml Natriumnitritlösung zu 1 ml Echtblau BB-Basislösung in ein Reagenzglas geben. Durch Schwenken mischen und mindestens 2 Minuten stehen lassen. Die Farbe ändert sich von schmutzigem Braun zu kräftigem Gelb. Die aktive Bildung von Gasblasen sollte vermieden werden.
- Die Lösung aus Schritt 2 zu 40 ml vorgewärmtem entionisiertem Wasser aus Schritt 1 geben.
- 5 ml TRIZMAL™ 7.6 Pufferkonzentrat hinzufügen.
- 1 ml α-Naphthylacetat-Lösung hinzufügen. Die Lösung sollte sich grünlich verfärben. Gut mischen und in einen Coplin-Färbetrog geben.
- Die Citrat-Aceton-Formaldehyd (CAF)-Lösung auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen. Die Objektträger durch Eintauchen in die CAF für 30 Sekunden fixieren. Die Objektträger in den letzten 5 Sekunden intensiv bewegen.
- Die Objektträger 45 bis 60 Sekunden lang unter fließendem entionisiertem Wasser abspülen und dann in die Lösung aus Schritt 5 geben. Die Objektträger nicht trocknen lassen.
- Für 30 Minuten bei 37 °C und vor Licht geschützt inkubieren.
- Die Objektträger nach 30 Minuten herausnehmen und mindestens 2 Minuten unter fließendem entionisiertem Wasser spülen.
- 2 Minuten in Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, gegenfärben.
- Mit Leitungswasser abspülen und trocknen.
- Mikroskopisch untersuchen. Wenn das Abdecken mit einem Deckglas erforderlich ist, darf nur ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden.

Anmerkungen

- Bei Verwendung von Columbia-Färbetrögen das Reagenzvolumen durch 5 teilen.
- Wenn das Substrat (siehe Schritt 5) eine Trübung aufweist, es auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen und gut mischen.
- Bei bereits vorfixierten und gelagerten Objektträgern die Fixierung (Schritte 6 und 7) überspringen und mit der Färbung der trockenen, vorfixierten Objektträger mit Schritt 8 beginnen.

Verfahren der Doppelfärbung mit Esterase

- Den α-Naphthylacetatesterase-Test wie unter Verfahren beschrieben durchführen. Nicht gegenfärben.
- Objektträger 5 Minuten mit entionisiertem Wasser abspülen.
- Den Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Test wie in den Verfahrensschritten 1–12 beschrieben durchführen. Dabei Schritt 6 auslassen.

Hinweis

Echtblau BB Basislösung kann durch Echttrotviolett LB Basislösung ersetzt werden, wenn für die Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase eine blaue Granulation bevorzugt wird.

α-Naphthylacetat-Esterase-Verfahren mit Fluorid-Inhibition

Obwohl α-Naphthylacetatesterase wie beschrieben hauptsächlich in Zellen monozytärer Abstammung gefunden wird, ist zu berücksichtigen, dass auch Megakaryozyten und Vorstufen von Erythrozyten positiv auf dieses Enzym reagieren.¹¹ Vereinzelt zeigen auch Lymphozyten und einige reife Granulozyten positive Reaktionen.⁴ Um diese Zellen eindeutig von Monozyten zu unterscheiden, wird dem Inkubationssystem Natriumfluorid zugesetzt. In Gegenwart dieser Verbindung wird das Enzym in den Monozyten inaktiviert.¹² Das folgende Verfahren kann zur Durchführung des Fluoridinhibitionstests verwendet werden.

- 2 ml Echtblau BB Basislösung mit 2 ml Natriumnitritlösung versetzen. Das Ganze vorsichtig durch Schwenken mischen. 2 Minuten ruhen lassen.
- 2 Bechergläser mit A und B beschriften und die folgenden Substanzen hinzugeben:

	Becherglas A	Becherglas B
Auf 37 °C vorgewärmtes entionisiertes Wasser	40 ml	40 ml
Diazotiertes Echtblau BB aus Schritt 1	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7.6 Konzentrat	5 ml	5 ml
α-Naphthylacetat-Lösung	1 ml	1 ml
Natriumfluorid-Lösung	-	1 ml

- Gut mischen und in die mit A und B gekennzeichneten Coplin-Färbetröge füllen.
- Mit den in den Schritten 6–12 des α-Naphthylacetatesterase-Verfahrens beschriebenen Schritten fortfahren.

Leistungsmerkmale

Bewertungsverfahren

Den Ausstrich scannen und einen schmalen Bereich mit wenigen Erythrozyten auswählen. Bereiche mit Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Aktivität erscheinen als hellrote Granulierung, solche mit α-Naphthylacetatesterase-Aktivität erscheinen dagegen als schwarze Granulierung. Die Bewertung reicht von 0 bis 4+ auf der Grundlage der Menge und Intensität der einzelnen Farbstoffe im Zytoplasma der jeweiligen Zelltypen. Die Merkmale der Bewertung stützen sich auf eine zum Teil subjektive Interpretation. Tabelle 1 enthält einen Vorschlag für ein Bewertungsschema. Schlussfolgerungen basieren auf der relativen Anwesenheit oder Abwesenheit der Färbung.

Tabelle 1. Charakteristika der Bewertung

Beurteilung der Zelle	Intensität der Färbung	Interpretation
0+	Kein	–
1+	Schwach bis mäßig	±
2+	Mäßig bis stark	+
3+	Stark	+
4+	Leuchtend	+

Erwartete Beobachtungen

Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase

(Echttrotviolett LB) – Dieses Enzym ist in der Regel spezifisch für Zellen mit granulozytärer Abstammung. Bereiche mit Aktivität weisen leuchtend rote Granulationen auf. In Monozyten und Lymphozyten ist die Aktivität nur schwach ausgeprägt oder gar nicht vorhanden.

α-Naphthylacetatesterase

(Echtblau BB) – Das Enzym lässt sich vor allem in Monozyten, Makrophagen und Histozyten nachweisen, während es in Granulozyten praktisch nicht vorhanden ist. Monozyten weisen eine schwarze Granulation auf. Gelegentlich weisen Lymphozyten eine gewisse Enzymaktivität auf.

Doppelfärbung mit Esterase

In Proben, die mit dem Doppelfärbeverfahren behandelt wurden, zeigen sich die Granulozyten mit roter Granulation und die Monozyten mit schwarzer Granulation.

α-Naphthylacetatesterase mit Fluorid-Inhibition

Mit Ausnahme von differenzierten Histozyten sowie spezialisierten Makrophagen im Gewebe, die ebenfalls eine Resistenz gegen Natriumfluorid aufweisen können, weisen Zellen der monozytären Abstammung keine Enzymaktivitäten auf.¹⁰

Qualitätskontrolle

Das Reagenzsystem sollte durch Verwendung von Positiv- und Negativkontroll-Objektträgern überwacht werden.

Positivkontroll-Objektträger können aus Proben spezifischer Zelllinien, die nachweislich positiv sind, hergestellt werden.

Alternativ kann auch antikoaguliertes Blut aus normalen Proben (bei Verwendung des α-Naphthylacetatesterase-Verfahrens vorzugsweise mit erhöhter Monozytenzahl) verwendet werden. Dabei ist jedoch eine weniger intensive Färbung und eine geringere Anzahl positiver Zellen zu beachten.

Als Negativkontrolle können Objektträger mit Proben von bekanntermaßen negativen Patienten verwendet werden. Falls nicht verfügbar, kann die Färbung einer Probe in einer Inkubationsmischung ohne das Substrat ebenfalls das gewünschte Ergebnis liefern. Die Verwendung der erstgenannten Methode wird jedoch dringend empfohlen.

Wenn die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen abweichen, wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von Sigma-Aldrich, um Unterstützung zu erhalten.

Analytische Leistungsmerkmale

Die Ergebnisse der analytischen Leistung für die gegebenen Tests, die für alle Zielstrukturen durchgeführt wurden, bestätigen eine 100%ige Sensitivität, Spezifität und Wiederholbarkeit.

Kat.-Nr.	Beschreibung des Produkts	Ziel	Intra-Assay-Spezifität	Intra-Assay-Empfindlichkeit	Inter-Assay-Spezifität	Inter-Assay-Empfindlichkeit
911	Naphthol-AS-D-Chloracetatlösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
912	Echttrotviolett LB Basislösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
913	TRIZMAL™ 6.3 Konzentrat	Osmolalität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
		pH-Wert	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
914	Nitratlösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
915	Citratlösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
916	α-Naphthylacetat-Lösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
917	Echtblau BB Basislösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
918	TRIZMAL™ 7.6 Konzentrat	Osmolalität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
		pH-Wert	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
919	Natriumfluorid-Lösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
GHS3	Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3

Warnungen und Gefahren

Aktuelle Risiko-, Gefahren- und Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt und auf der Produktkennzeichnung.

91A:



- H226 Entzündliche Flüssigkeit und Dampf.
- H290 Kann ätzend auf Metalle wirken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H312 + H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder beim Einatmen.
- H319 Verursacht schwere Augenreizungen.
- H370 Verursacht Schäden an Organen (Augen, zentrales Nervensystem).
- H412 Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Rauchen verboten.
- P273 Freisetzung in die Umwelt ist zu vermeiden.
- P280 Tragen Sie Schutzhandschuhe/Schutzbekleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz.
- P301 + P310 BEI VERSCHLUCKEN: Rufen Sie sofort eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.
- P303 + P361 + P353 BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Die Haut mit Wasser abspülen.
- P304 + P340 + P312 BEIM EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie dafür, dass sie bequem atmen kann. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE/einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.

91C:



- H290 Kann ätzend auf Metalle wirken.
- H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann eine allergische Reaktion der Haut verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H360FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das ungeborene Kind schädigen.
- H373 Kann bei Verschlucken bei längerer oder wiederholter Exposition die Organe (Niere) schädigen.
- P202 Nicht handhaben, bevor Sie nicht alle Sicherheitshinweise gelesen und verstanden haben.
- P280 Tragen Sie Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz.
- P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE/einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.
- P302 + P352 BEI HAUTKONTAKT: Mit viel Wasser waschen.
- P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.
- P308 + P313 Bei Exposition oder Möglichkeit einer Exposition: Holen Sie sich ärztlichen Rat/ärztliche Hilfe.

Wenn während der Verwendung dieses Geräts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall eingetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und/oder seinem bevollmächtigten Vertreter sowie Ihrer nationalen Behörde.

Symbol-Definitionen

Symbole gemäß der Definition in EN ISO 15223-1:2021

	Hersteller		Katalognummer
	Anweisungen für den Gebrauch beachten		Chargencode
	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/ Europäischen Union		Konformitätserklärung der Europäischen Union (definiert in IVDR 2017/746)
	Verfallsdatum		Medizinisches In-vitro-Diagnosegerät
	Temperatur-Grenzwert		Vorsicht
	Datum der Herstellung		Importeur
	Weist auf den bevollmächtigten Vertreter in der Schweiz hin		

Referenzen

1. Beckmann J, Neth R, Gaedick G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Kontaktinformationen

Um eine Bestellung aufzugeben, besuchen Sie bitte unsere Website unter [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Für den technischen Service besuchen Sie bitte die technische Service-Seite auf unserer Website unter [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorie

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Die neue Vorlage mit aktuellem Branding wurde angewandt. In Verwendungszweck und Vorsichtsmaßnahmen wurde die Nennung der gewerblichen Verwendung hinzugefügt. Die Aussage über die Hilfe bei der Diagnose wurde in den Verwendungszweck verschoben. Überarbeitung des Verwendungszwecks zur Angleichung an die IVDR-Richtlinien. Materialsicherheitsdatenblatt wurde in Sicherheitsdatenblatt geändert. Kontaktinformationen wurden aktualisiert. Die Anweisung, CLSI für die Probenentnahme zu befolgen, wurde entfernt. EN 980 wurde gestrichen und in EN ISO 15223-1:2021 für Symbole geändert. Kontaktinformationen für unerwünschte Ereignisse wurden hinzugefügt. Literaturhinweise wurden aktualisiert. Eine Tabelle zur Revisionshistorie wurde hinzugefügt. Warnungen und Gefahren hinzugefügt. CH-REP-Informationen wurden hinzugefügt.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Die Initiale M und Sigma-Aldrich sind Marken der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland oder ihrer Tochtergesellschaften. Alle anderen Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber. Ausführliche Informationen über Marken sind über öffentlich zugängliche Quellen erhältlich.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Mode d'emploi

Kit leucocyte α -naphtyle acétate (estérase non spécifique) et leucocyte naphthol AS-D chloroacétate (estérase spécifique)

Procédure n° 91



Utilisation prévue

Les kits naphthol AS-D chloroacétate estérase et α -naphtyle acétate estérase de Sigma-Aldrich sont destinés à la coloration histologique générale en laboratoire. Les réactifs naphthol AS-D chloroacétate estérase et α -naphtyle acétate estérase sont réservés à un usage professionnel de « diagnostic *in vitro* ». Cette procédure histochemie manuelle et qualitative met en évidence l'activité de la chloroacétate estérase du naphthol AS-D et de l'acétate estérase de l' α -naphtyle dans les leucocytes du sang humain, dans les frottis de moelle osseuse ou dans les empreintes tissulaires. La visualisation histologique des estérases cellulaires leucocytaires est une technique unique couramment utilisée en médecine.

Les estérases cellulaires sont ubiquitaires, constituant une série de plusieurs enzymes agissant sur des substrats sélectionnés. Dans des conditions réactionnelles définies, il peut être possible de déterminer les types des cellules hématopoïétiques, en utilisant des substrats spécifiques des estérases. Les méthodes décrites permettent aux hématologistes et hématopathologistes de différencier les granulocytes des monocytes.¹⁻⁷

Pour réaliser le test, les frottis sanguins, les frottis médullaires ou les empreintes tissulaires sont incubés avec soit du naphthol AS-D-chloroacétate (NCAE) soit de l' α -naphtyle acétate (NAE) en présence d'un sel de diazonium tout juste formé. L'hydrolyse enzymatique des liaisons ester libère des composés naphthéniques libres. Ceux-ci se couplent avec le sel de diazonium, formant ainsi des dépôts fortement colorés sur les sites d'activité de l'enzyme.

Les procédures les plus récentes, y compris celles fournies par Sigma-Aldrich, utilisent des sels de diazonium stables. Ces sels sont formés en faisant réagir une arylamine avec du nitrite de sodium en milieu acide.⁸ Le chlorure de diazonium qui en résulte (généralement instable) peut ensuite être traité avec des composés tels que du chlorure de zinc, du sulfate de zinc ou du naphthalène-1,6-disulfonate, formant ainsi des sels stables. Ces stabilisateurs peuvent exercer une inhibition marquée sur certains systèmes enzymatiques, alors que les chlorures de diazonium sont moins inhibiteurs.⁹ C'est pourquoi Sigma-Aldrich propose désormais des solutions stables pour le Fast Red Violet LB Base, le Fast Blue BB Base et le nitrite de sodium pour la cytochimie des estérases. Pour simplifier davantage ces méthodes, des solutions stables de naphthol AS-D chloroacétate et d' α -naphtyle acétate sont incluses. La disponibilité de ces solutions stables permet au client d'ajuster les volumes de travail des réactifs en fonction des besoins, éliminant ainsi le gaspillage.

Réactifs

Solution de naphthol AS-D chloroacétate (réf. 911-10ML)

Naphthol AS-D chloroacétate, 8 mg/ml et stabilisateur. Avertissement. Provoque une irritation oculaire. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Solution Fast Red Violet LB Base (réf. 912-10ML)

Fast Red Violet LB Base, 15 mg/ml, dans de l'acide chlorhydrique à 0,4 mol/l avec stabilisateur. Danger. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Concentré TRIZMAL™ 6.3 (réf. 913-50ML)

Maléate TRIZMA®, 1 mol/l avec agent tensioactif. pH 6,3 $\pm$ 0,15 à 25 °C. Danger. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Solution de nitrite de sodium (réf. 914-10ML)

Nitrite de sodium, 0,1 mol/l.

Solution de citrate (réf. 915-50ML)

Acide citrique, 18 mmol/l, citrate de sodium, 9 mmol/l, chlorure de sodium, 12 mmol/l et agent tensioactif. pH 3,6 $\pm$ 0,1 à 25 °C.

Solution d' α -naphtyle acétate (réf. 916-10ML)

α -naphtyle acétate, 12,5 mg/ml, dans une solution de méthanol avec stabilisateurs. Danger. Liquide et vapeurs inflammables. Toxique en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané ou par inhalation. Provoque une irritation cutanée légère. Provoque une sévère irritation des yeux. Risque avéré d'effets graves pour les organes.

Solution Fast Blue BB Base (réf. 917-10ML)

Fast Blue BB Base, 15 mg/ml, C.I. 37175 dans de l'acide chlorhydrique à 0,4 mol/l avec stabilisateurs. Avertissement. Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée légère. Provoque une sévère irritation des yeux. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées.

Concentré TRIZMAL™ 7.6 (réf. 918-50ML)

Maléate TRIZMA®, 1 mol/l avec agent tensioactif. pH 7,6 $\pm$ 0,15 à 25 °C. Danger. Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires. Nocif pour les organismes aquatiques.

Solution d'hématoxyline de Gill n° 3 (réf. GHS3-50ML)

Hématoxyline certifiée, 6,0 g/l, C.I. 75290, iodate de sodium, 0,6 g/l, et sulfate d'aluminium, 52,8 g/l, avec stabilisateurs. Danger. Nocif en cas d'ingestion. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Solution de fluorure de sodium (réf. 919-25ML)

Fluorure de sodium, 20 g/l. Avertissement. Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée légère.

Matériel spécial requis mais non fourni

- Acétone, de qualité réactif ou de qualité ACS
- Formaldéhyde, 37 %, de qualité ACS
- Solution de fluorure de sodium, réf. 919-25ML (nécessaire pour la procédure d'inhibition de l' α -naphtyle acétate estérase par le fluorure)

Conservation et stabilité

Conservé la solution d'hématoxyline de Gill n° 3 à température ambiante (entre 18 et 26 °C) à l'abri de la lumière. Conserver les autres réactifs au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C).

Le concentré TRIZMAL™ 6.3, le concentré TRIZMAL™ 7.6 et la solution de citrate peuvent être utilisés en l'absence de croissance microbienne. Les autres réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur les étiquettes.

Détérioration

Jeter le concentré TRIZMAL™ et la solution de citrate si une croissance microbienne est observée. Jeter la solution d'hématoxyline de Gill n° 3 si elle devient marron (trop oxydée par l'air) ou violette (perte d'acidité).

Préparation

Équilibrer tous les réactifs à température ambiante (entre 18 et 26 °C) avant de les utiliser. Les réactifs de détection des estérases sont fournis prêts à l'emploi.

Fixateur à base de citrate-acétone-formaldéhyde : ajouter 65 ml d'acétone et 8 ml de formaldéhyde à 37 % à 25 ml de solution de citrate. Verser la solution dans un flacon en verre et boucher hermétiquement. Conserver cette solution au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). L'équilibrer à température ambiante (entre 18 et 26 °C) avant de l'utiliser. Elle est stable jusqu'à 4 semaines si elle est conservée hermétiquement fermée au réfrigérateur.

Précautions

Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* inclus dans ces kits sont destinés à être utilisés en diagnostic *in vitro* au sein de laboratoires de biologie médicale. Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à un usage professionnel par un personnel qualifié uniquement. Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de Sigma-Aldrich peuvent être utilisés par le personnel de laboratoire formé à la manipulation d'échantillons humains potentiellement infectieux, à l'utilisation de microscopes et d'autres équipements de laboratoire et possédant une perception des couleurs et une acuité visuelle permettant de distinguer les couleurs ainsi que les autres objets au microscope.

Suivre les précautions habituelles lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets en respectant toutes les réglementations locales et nationales.

Procédure

Prélèvement des échantillons

Aucune méthode de test connue ne peut totalement garantir que les échantillons de sang ou de tissu ne transmettront pas d'infection. Par conséquent, tous les produits sanguins ou échantillons de tissu doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Les frottis sanguins, les frottis médullaires, les empreintes tissulaires et les préparations obtenues par cytocentrifugation peuvent être utilisés à la fois avec l' α -naphtyle acétate estérase et la naphthol AS-D chloroacétate estérase. L'EDTA ou l'héparine serviront d'anticoagulants.⁹ Les tissus congelés et inclus en paraffine peuvent être utilisés avec la naphthol AS-D chloroacétate estérase. L' α -naphtyle acétate estérase peut être utilisée avec succès sur des coupes de tissus congelés.¹⁰ Les frottis sanguins ou médullaires peuvent être conservés fixés à température ambiante (entre 18 et 26 °C) pendant plusieurs semaines ou non fixés pendant plusieurs jours sans aucun changement notable de l'activité.^{4,9} Ne pas expédier le sang total à analyser vers d'autres laboratoires. Envoyer soit des lames fixées soit des lames non fixées. Les lames doivent être conservées au frais pendant le transport. Laisser les frottis sécher au moins 1 heure avant de les fixer.

Limites de la procédure

Les procédures décrites sont réalisées à 37 °C. Si les réactifs ne sont pas à cette température, il est possible que les réactions obtenues soient faibles ou bien négatives. Il est recommandé de vérifier les températures en utilisant un thermomètre précis. Les bains-marie à température contrôlée sont plus efficaces que les incubateurs à air chaud et ils doivent être utilisés pour les méthodes cytochimiques enzymatiques. Le transfert de chaleur à travers le verre est plus rapide qu'à travers le plastique, il convient donc d'utiliser des cuves à coloration de Coplin en verre.

De nombreux systèmes enzymatiques sont sensibles à des traces infimes de détergent. Le lavage de la verrerie avec de l'eau de Javel diluée, suivi d'un rinçage abondant à l'eau déionisée, empêchent l'effet du détergent sur les enzymes cellulaires.

Le système de fixation décrit dans la section « Réactifs » contient du formaldéhyde. Si le fixateur n'est pas complètement éliminé par un rinçage vigoureux, toute quantité de formaldéhyde, soit concentrée sur des lames séchées à l'air libre, soit à l'état de traces sur des lames humides, ajoutée au système d'incubation peut entraîner l'inhibition de l'enzyme. Pour éviter la perte du frottis sanguin pendant le processus de rinçage, diriger le jet d'eau sur la lame au-dessus de l'arête vive. Rincer les deux côtés de la lame.

Les résultats sont basés sur un certain degré d'interprétation subjective. Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs normales.

Remarques

Les utilisateurs des kits 390A et 91C de Sigma doivent faire preuve de prudence lorsqu'ils utilisent les tampons concentrés TRIZMA®, réf. 913 et 903C, car ils ne sont pas interchangeables. L'utilisation du mauvais tampon entraînera une réaction négative.

Procédure

Les procédures décrites sont réalisées à 37 °C.

Procédure de détection de la naphthol AS-D chloroacétate estérase

- Préchauffer suffisamment d'eau déionisée à 37 °C pour l'utilisation du substrat. Vérifier la température avant de l'utiliser.
- Juste avant la fixation, ajouter 1 ml de solution de nitrite de sodium à 1 ml de solution Fast Red Violet LB Base dans un tube à essai. Mélanger délicatement par inversion et laisser reposer pendant 2 minutes. Éviter la formation de bulles.
- Ajouter la solution de l'étape 2 à 40 ml d'eau déionisée préchauffée de l'étape 1.
- Ajouter 5 ml de tampon concentré TRIZMAL™ 6.3. (Voir les « Remarques ».)
- Ajouter 1 ml de solution de naphthol AS-D chloroacétate. La solution doit devenir rouge. Bien mélanger et verser dans une cuve à coloration de Coplin.
- Équilibrer la solution de citrate-acétone-formaldéhyde (CAF) à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Fixer les lames en les immergeant dans la solution de citrate-acétone-formaldéhyde (CAF) pendant 30 secondes.
- Rincer soigneusement les lames sous un filet d'eau déionisée pendant 45 à 60 secondes, puis les placer dans la solution de l'étape 5. Ne pas laisser les lames sécher.
- Incuber pendant 15 minutes à 37 °C à l'abri de la lumière.

- Au bout des 15 minutes, retirer les lames et les rincer soigneusement dans de l’eau déionisée pendant au moins 2 minutes.
- Contre-colorer pendant 2 minutes dans la solution d’hématoxyline de Gill n° 3.
- Rincer à l’eau du robinet et laisser sécher à l’air libre.
- Examiner les lames au microscope. S’il est nécessaire de monter les lames avec des lamelles couvre-objet, utiliser uniquement un milieu de montage aqueux.

Remarques

- En cas d’utilisation de cuves à coloration Columbia, diviser les volumes des réactifs par 5.
- Si le substrat (voir étape 5) semble trouble, l’équilibrer à température ambiante (entre 18 et 26 °C) et bien le mélanger.
- Si les lames ont été préfixées et stockées, ignorer les étapes de fixation (étapes 6 et 7) et commencer la coloration des lames préfixées sèches à l’étape 8.

Procédure de détection de l’α-naphtyle acétate estérase

- Préchauffer suffisamment d’eau déionisée à 37 °C pour l’utilisation du substrat. Vérifier la température avant de l’utiliser.
- Juste avant la fixation, ajouter 1 ml de solution de nitrite de sodium à 1 ml de solution de Fast Blue BB Base dans un tube à essai. Mélanger par inversion et laisser reposer pendant au moins 2 minutes. La couleur va passer d’un marron sale à un jaune profond. Éviter la formation de bulles.
- Ajouter la solution de l’étape 2 à 40 ml d’eau déionisée préchauffée de l’étape 1.
- Ajouter 5 ml de tampon concentré TRIZMAL™ 7.6.
- Ajouter 1 ml de solution d’α-naphtyle acétate. La solution doit devenir verdâtre. Bien mélanger et verser dans une cuve à coloration de Coplin.
- Équilibrer la solution de citrate-acétone-formaldéhyde (CAF) à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Fixer les lames en les immergeant dans la solution de citrate-acétone-formaldéhyde (CAF) pendant 30 secondes. Agiter vigoureusement les lames pendant les 5 dernières secondes.
- Rincer soigneusement les lames sous un filet d’eau déionisée pendant 45 à 60 secondes, puis les placer dans la solution de l’étape 5. Ne pas laisser les lames sécher.
- Incuber pendant 30 minutes à 37 °C à l’abri de la lumière.
- Au bout des 30 minutes, retirer les lames et les rincer soigneusement sous un filet d’eau déionisée pendant au moins 2 minutes.
- Contre-colorer pendant 2 minutes dans la solution d’hématoxyline de Gill n° 3.
- Rincer à l’eau du robinet et laisser sécher à l’air libre.
- Examiner les lames au microscope. S’il est nécessaire de monter les lames avec des lamelles couvre-objet, utiliser uniquement un milieu de montage aqueux.

Remarques

- En cas d’utilisation de cuves à coloration Columbia, diviser les volumes des réactifs par 5.
- Si le substrat (voir étape 5) semble trouble, l’équilibrer à température ambiante (entre 18 et 26 °C) et bien le mélanger.
- Si les lames ont été préfixées et stockées, ignorer les étapes de fixation (étapes 6 et 7) et commencer la coloration des lames préfixées sèches à l’étape 8.

Procédure de double coloration des estérases

- Réaliser le test de détection de l’α-naphtyle acétate estérase comme décrit dans la procédure. Ne pas contre-colorer.
- Rincer les lames pendant 5 minutes dans de l’eau déionisée.
- Réaliser le test de détection de la naphтол AS-D chloroacétate estérase comme décrit aux étapes 1 à 12 de la procédure. Ignorer l’étape 6.

Remarque

La solution Fast Blue BB Base peut être remplacée par la solution Fast Red Violet LB Base si l’on préfère avoir des granulations bleues pour la détection de la naphтол AS-D chloroacétate estérase.

Procédure de détection de l’α-naphtyle acétate estérase avec inhibition par le fluorure

Bien que l’α-naphtyle acétate estérase se retrouve principalement dans les cellules de la lignée monocyttaire lorsque le test est réalisé comme décrit, il faut reconnaître que les mégacaryocytes et les précurseurs de la lignée érythrocytaire sont positifs pour cette enzyme.¹¹ Les lymphocytes et certains granulocytes matures présentent également quelques fois une positivité.⁴ Pour différencier de manière concluante ces cellules des monocytes, du fluorure de sodium est incorporé au système d’incubation. L’enzyme des monocytes est inactivée en présence de ce composé.¹² La procédure suivante peut être utilisée pour réaliser le test d’inhibition par le fluorure.

- Ajouter 2 ml de solution de nitrite de sodium à 2 ml de solution de Fast Blue BB Base. Mélanger délicatement par inversion. Laisser reposer pendant 2 minutes.
- Étiqueter 2 béchers A et B et ajouter les solutions suivantes :

	Bécher A	Bécher B
Eau déionisée préchauffée à 37 °C	40 ml	40 ml
Fast Blue BB diazotisé de l’étape 1	2 ml	2 ml
Concentré TRIZMAL™ 7.6	5 ml	5 ml
Solution d’α-naphtyle acétate	1 ml	1 ml
Solution de fluorure de sodium	-	1 ml

- Bien mélanger et verser dans des cuves à coloration de Coplin étiquetées A et B.
- Procéder comme décrit aux étapes 6 à 12 de la procédure de détection de l’α-naphtyle acétate estérase.

Caractéristiques de performance

Méthode de détermination du score

Examiner le frottis et sélectionner une petite zone avec peu d’érythrocytes. Les sites d’activité de la naphтол AS-D chloroacétate estérase apparaissent sous la forme de granulations rouge vif et ceux de l’α-naphtyle acétate estérase sous la forme de granulations noires. Leur attribuer un score compris entre 0 et 4+ en fonction de la quantité et de l’intensité de chaque colorant à l’intérieur du cytoplasme des différents types de cellules. Les caractéristiques de détermination du score reposent en partie sur une interprétation subjective. Une suggestion de format de détermination du score est présentée dans le Tableau 1. Les conclusions sont centrées sur la présence relative ou l’absence de coloration.

Tableau 1. Caractéristiques de détermination du score

Score des cellules	Intensité de la coloration	Interprétation
0+	Aucune	–
1+	Faible à modérée	±
2+	Modérée à forte	+
3+	Forte	+
4+	Intense	+

Observations attendues

Naphtol AS-D chloroacétate estérase

(Fast Red Violet LB) - Cette enzyme est habituellement considérée comme étant spécifique des cellules de la lignée granulocytaire. Les sites d’activité présentent des granulations rouge vif. L’activité est faible ou absente dans les monocytes et les lymphocytes.

α-naphtyle acétate estérase

(Fast Blue BB) - Cette enzyme est détectée principalement dans les monocytes, les macrophages et les histiocytes, et est pratiquement absente des granulocytes. Les monocytes doivent présenter des granulations noires. Les lymphocytes peuvent parfois présenter une activité enzymatique.

Double coloration des estérases

Les échantillons traités avec la procédure de double coloration mettront en évidence les granulocytes avec des granulations rouges et les monocytes avec des granulations noires.

α-naphtyle acétate estérase avec inhibition par le fluorure

Toutes les cellules de la lignée monocyttaire seront négatives pour l’activité enzymatique, à l’exception des histiocytes différenciés ou des macrophages spécialisés dans les tissus qui peuvent également être résistants au fluorure de sodium.¹⁰

Contrôle qualité

Le système composant les réactifs doit être contrôlé en utilisant des lames de contrôle positives et négatives.

Des lames de contrôle positives peuvent être préparées à partir de lignées cellulaires spécifiques dont la positivité est connue.

Il est également possible d’utiliser du sang anticoagulé issu d’échantillons sains (de préférence avec un nombre accru de monocytes si l’on utilise la procédure de détection de l’α-naphtyle acétate estérase). Toutefois, la coloration sera moins intense et les cellules positives moins nombreuses.

Des lames de patients négatifs connus peuvent être utilisées comme contrôle négatif. Si aucune lame de ce type n’est disponible, la coloration d’un échantillon dans un mélange d’incubation sans ajout du substrat donnera les résultats souhaités. Toutefois, l’utilisation de la première option est vivement recommandée.

Si les résultats observés diffèrent des résultats attendus, contacter le service technique de Sigma-Aldrich pour obtenir de l’aide.

Caractéristiques de performance analytique

Les résultats des performances analytiques pour les tests concernés effectués sur toutes les structures cibles confirment une sensibilité, une spécificité et une répétabilité de 100 %.

Réf.	Description du produit	Cible	Spécificité intra-série	Sensibilité intra-série	Spécificité inter-séries	Sensibilité inter-séries
911	Solution de naphтол AS-D chloroacétate	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
912	Solution Fast Red Violet LB Base	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
913	Concentré TRIZMAL™ 6.3	Osmolalité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
		pH	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
914	Solution de nitrite de sodium	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
915	Solution de citrate	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
916	Solution d’α-naphtyle acétate	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
917	Solution de Fast Blue BB Base	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
918	Concentré TRIZMAL™ 7.6	Osmolalité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
		pH	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
919	Solution de fluorure de sodium	Sites d’activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
GHS3	Solution d’hématoxyline de Gill n° 3	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3

Avertissements et risques

Se reporter à la fiche de données de sécurité et à l’étiquetage du produit pour obtenir des informations mises à jour concernant les risques, les dangers et la sécurité.

91A:



H226 Liquide et vapeurs inflammables.

H290 Peut être corrosif pour les métaux.

H301 Toxique en cas d’ingestion.

H312 + H332 Nocif par contact cutané ou par inhalation.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H370 Risque avéré d’effets graves pour les organes (yeux, système nerveux central).

H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P210 Tenir à l’écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d’inflammation. Ne pas fumer.

P273 Éviter le rejet dans l’environnement.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P301 + P310 EN CAS D’INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P303 + P361 + P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l’eau.

P304 + P340 + P312 EN CAS D’INHALATION : transporter la personne à l’extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

91 C:



H290 Peut être corrosif pour les métaux.

H302 Nocif en cas d'ingestion.

H315 Provoque une irritation cutanée.

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

H318 Provoque des lésions oculaires graves.

H335 Peut irriter les voies respiratoires.

H360FD Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.

H373 Risque présumé d'effets graves pour les organes (reins) à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée par ingestion.

P202 Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P301 + P312 EN CAS D'INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P302 + P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau.

P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P308 + P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.

Si, au cours de l'utilisation de ce dispositif ou à la suite de son utilisation, un incident grave se produit, le signaler au fabricant et/ou à son représentant agréé ainsi qu'aux autorités nationales compétentes.

Définition des symboles

Symboles tels que définis dans la norme EN ISO 15223-1:2021

	Fabricant		Référence catalogue
	Consulter le mode d'emploi		Numéro du lot
	Représentant agréé dans la Communauté européenne/ l'Union européenne		Déclaration de conformité de l'Union européenne (définie dans le règlement 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i>)
	Date limite d'utilisation		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Limites de température		Attention
	Date de fabrication		Importateur
	Indique le représentant agréé en Suisse		

Références

1. Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Coordonnées

Pour passer commande, consulter notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Pour le service technique, consulter la page du service technique sur notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historique des révisions

Rév. 4.0	2014
Rév. 5.0	2016
Rév. 6.0	2023

Transfert vers un nouveau modèle avec l'image de marque actuelle. Précision de l'usage professionnel dans l'utilisation prévue et les précautions. Déplacement de la déclaration relative à l'aide au diagnostic vers l'utilisation prévue. Révision de l'utilisation prévue afin de l'aligner sur les recommandations de la réglementation relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Remplacement du texte « Material Safety Data Sheet » par « Safety Data Sheet » dans la version anglaise. Mise à jour des coordonnées. Suppression de l'instruction indiquant de suivre les normes et recommandations du CLSI pour le prélèvement des échantillons. Remplacement de la norme EN 980 par la norme EN ISO 15223-1:2021 pour les symboles. Ajout de coordonnées en cas d'événements indésirables. Mise à jour des références bibliographiques. Ajout d'un tableau d'historique des révisions. Ajout de la section relative aux avertissements et risques. Ajout des informations sur le représentant agréé en Suisse.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Le M majuscule et Sigma-Aldrich sont des marques de commerce de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne ou de ses filiales. Toutes les autres marques sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. Des informations détaillées sur les marques de commerce sont disponibles via des ressources accessibles au public.

Sigma-Aldrich®

Istruzioni per l'uso

Kit per α -Naftil acetato leucocitario (esterasi non specifica) e kit per naftolo AS-D cloroacetato leucocitario (esterasi specifica)

Procedura n. 91

IVD

CE

MILLIPORE
SIGMA

Uso previsto

I kit Sigma-Aldrich per naftolo AS-D cloroacetato esterasi e α -Naftil acetato esterasi sono previsti per l'uso come coloranti istologici generali destinati all'uso in laboratorio. I reagenti naftolo AS-D cloroacetato esterasi e α -naftil acetato esterasi sono destinati soltanto alla "diagnostica in vitro" professionale. Questa procedura qualitativa manuale istochimica rileva l'attività di AS-D cloroacetato esterasi e α -naftil acetato esterasi nei leucociti relativi a strisci ematici o midollari umani e a preparati ottenuti per apposizione di tessuti. La visualizzazione istologica della esterasi cellulare leucocitaria è una tecnica unica al momento comunemente utilizzata in medicina.

Le esterasi cellulari sono ubiquitarie e rappresentano apparentemente una serie di vari enzimi che agiscono su substrati selezionati. In condizioni di reazione definite, potrebbe essere possibile determinare le cellule emopoietiche, utilizzando substrati specifici per esterasi. I metodi descritti offrono a ematologi e ematopatologi i mezzi per differenziare i granulociti dai monociti.¹⁻⁷

Per eseguire il test, incubare gli strisci ematici e midollari o i preparati per apposizione di tessuti con naftolo AS-D cloroacetato (NCAE) o α -naftil acetato (NAE) in presenza di un sale di diazonio di recente formazione. L'idrolisi enzimatica di legami estere libera composti di naftolo liberi, che si legano con il sale di diazonio, formando depositi altamente colorati nelle sedi di attività enzimatica.

La maggior parte delle procedure più innovative, inclusa quella fornita da Sigma-Aldrich, utilizza sali di diazonio stabili. Questi derivano dalla reazione di un'arilamina con nitrito di sodio e in un mezzo acido.⁸ Il risultante cloruro di diazonio (solitamente instabile) può essere quindi trattato con composti quali cloruro di zinco, solfato di zinco o naftalene-1,6-disolfonato, formando sali stabili. A differenza dei cloruri di diazonio, questi stabilizzanti possono essere fortemente inibenti verso alcuni sistemi enzimatici.⁸ Per questo motivo, Sigma-Aldrich fornisce ora soluzioni stabili di fast Red Violet LB Base, Fast Blue BB Base e nitrito di sodio per la citochimica dell'esterasi. Per semplificare ulteriormente questi metodi, la dotazione include soluzioni stabili di naftolo AS-D cloroacetato e α -naftil acetato. La disponibilità di queste soluzioni stabili consente al cliente di regolare i volumi dei reagenti di lavoro in funzione delle esigenze, eliminando gli sprechi.

Reagenti

Soluzione di naftolo AS-D cloroacetato (N. di cat. 911-10ML)

Naftolo AS-D cloroacetato, 8 mg/ml e stabilizzante. Avvertenza. Provoca irritazione oculare. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

Soluzione Fast Red Violet LB Base (N. di cat. 912-10ML)

Fast Red Violet LB Base, 15 mg/ml, in 0,4 mol/l di acido cloridrico con stabilizzante. Pericolo. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

TRIZMAL™ 6.3 Concentrate (N. di cat. 913-50ML)

TRIZMA® maleato, 1 mol/l, con tensioattivo. pH 6,3±0,15 a 25 °C. Pericolo. Provoca irritazione cutanea. Può provocare una reazione cutanea allergica. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

Soluzione di nitrito di sodio (N. di cat. 914-10ML)

Nitrito di sodio, 0,1 mol/l.

Soluzione di citrato (N. di cat. 915-50ML)

Acido citrico, 18 mmol/l, citrato di sodio, 9 mmol/l, cloruro di sodio, 12 mmol/l, con tensioattivo. pH 3,6±0,1 a 25 °C

Soluzione di α -naftil acetato (N. di cat. 916-10ML)

α -naftil acetato, 12,5 mg/ml, in soluzione metanolica con stabilizzanti. Pericolo. Liquido e vapore infiammabili. Tossico se ingerito. Nocivo per contatto con la pelle o se inalato. Provoca una lieve irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Provoca danni agli organi.

Soluzione Fast Blue BB Base (N. di cat. 917-10ML)

Fast Blue BB Base, 15 mg/ml, C.I. 37175, in 0,4 mol/l di acido cloridrico con stabilizzanti. Avvertenza. Nocivo se ingerito. Provoca una lieve irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo.

TRIZMAL™ 7.6 Concentrate (N. di cat. 918-50ML)

TRIZMA® maleato, 1 mol/l, con tensioattivo. pH 7,6±0,15 a 25 °C. Pericolo. Provoca irritazione cutanea. Provoca gravi lesioni oculari. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Può irritare le vie respiratorie. Nocivo per gli organismi acquatici.

Soluzione di ematossilina di Gill, N. 3 (N. di cat. GHS3-50ML)

Ematossilina certificata, 6,0 g/l, C.I. 75290, iodato di sodio, 0,6 g/l, e solfato di alluminio, 52,8 g/l, con stabilizzanti. Pericolo. Nocivo se ingerito. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

Soluzione di fluoruro di sodio (N. di cat. 919-25 ML)

Fluoruro di sodio, 20 g/l. Avvertenza. Nocivo se ingerito. Provoca una lieve irritazione cutanea.

Materiali specifici necessari, ma non forniti in dotazione

- Acetone, reagente grado ACS
- Formaldeide, 37%, ACS
- Soluzione di fluoruro di sodio, N. di cat. 919-25ML (richiesta per la procedura per α -naftil acetato esterasi e inibizione con fluoruro).

Conservazione e stabilità

Conservare la soluzione di ematossilina di Gill, N. 3 a temperatura ambiente (18-26 °C), al riparo dalla luce. Conservare gli altri reagenti in frigorifero (2-8 °C).

TRIZMAL™ 6.3 Concentrate, TRIZMAL™ 7.6 Concentrate e la soluzione di citrato sono idonei per l'uso in assenza di crescita microbica. Altri reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.

Deterioramento

Scartare TRIZMAL™ Concentrate e la soluzione di citrato se si evidenzia una crescita microbica. Scartare la soluzione di ematossilina di Gill, N. 3 se la soluzione diventa marrone (iperossidazione causata dall'aria) o porpora (perdita di acidità).

Preparazione

Scaldare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-26 °C) prima dell'uso. I reagenti per l'esterasi sono forniti pronti per l'uso.

Fissativo a base di citrato-acetone-formaldeide: aggiungere 65 ml di acetone e 8 ml di formaldeide al 37% a 25 ml di la soluzione di citrato. Versare in un flaconcino di vetro e avvitare bene il tappo. Conservare in frigorifero (2-8 °C). Portare a temperatura ambiente (18-26 °C) prima dell'uso. Stabile fino a 4 settimane se conservato ben chiuso in frigorifero.

Precauzioni

Gli IVD inclusi in questi kit sono destinati alla diagnostica in vitro in un ambiente di laboratorio clinico. Questi IVD sono destinati esclusivamente all'uso professionale da parte di personale qualificato. Gli IVD Sigma-Aldrich devono essere utilizzati da personale di laboratorio addestrato alla manipolazione di campioni biologici umani potenzialmente infettivi, come anche all'uso di microscopi e altre apparecchiature di laboratorio, che abbia la percezione del colore e l'acuità visiva necessari a distinguere i colori e altri oggetti al microscopio.

Seguire le normali precauzioni adottate nella manipolazione dei reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti attenendosi a tutte le normative vigenti a livello locale, provinciale, regionale o nazionale.

Procedura

Raccolta dei campioni

Nessun metodo di analisi noto può garantire in modo assoluto che i campioni di sangue o tessuto non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i derivati del sangue o i campioni di tessuto devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Gli strisci ematici e midollari, i preparati ottenuti per apposizione di tessuti o per citocentrifuga possono essere utilizzati sia con α -naftil acetato esterasi sia con naftolo AS-D cloroacetato esterasi. Come anticoagulanti usare EDTA o eparina.⁹ È possibile utilizzare i tessuti congelati e inclusi in paraffina con naftolo AS-D cloroacetato esterasi. Si può utilizzare con successo l' α -naftil acetato esterasi su sezioni di tessuto congelate.¹⁰ Gli strisci ematici o midollari, se fissati, possono essere conservati a temperatura ambiente (18-26 °C) per diverse settimane o, se non fissati, per diverse giorni senza variazioni apprezzabili dell'attività.^{4,9} Non spedire i campioni di sangue intero per l'analisi presso altri laboratori. Inviare vetrini fissati o non fissati. Conservare i vetrini in borsa termica durante il trasporto. Lasciare asciugare i vetrini per almeno 1 ora prima della fissazione.

Limiti della procedura

Le procedure descritte vengono eseguite a 37 °C. Se i reagenti non sono a questa temperatura, si possono ottenere reazioni deboli o negative. Si consiglia di controllare le temperature con un termometro preciso. I bagnomaria a temperatura controllata sono più efficienti degli incubatori ad aria calda e si consiglia di utilizzarli per i metodi per colorazione citochimica per la determinazione dell'attività enzimatica. Lo scambio di calore attraverso il vetro è più rapido che attraverso la plastica, quindi è consigliabile utilizzare vaschette tipo Coplin in vetro.

Molti sistemi enzimatici sono sensibili a minime tracce di detergente. Lavare il materiale di vetro con candeggina diluita e risciacquare quindi in abbondanti quantità di acqua deionizzata previene l'effetto detergente sugli enzimi cellulari.

Il sistema fissativo descritto nella sezione "Reagenti" contiene formaldeide. Se il fissativo non viene eliminato completamente con un risciacquo vigoroso, qualunque quantità di aldeide, concentrata su vetrini asciugati all'aria o in tracce rilasciate da vetrini bagnati, che confluisce nel sistema di incubazione può inibire l'enzima. Per evitare che uno striscio ematico vada perduto durante il risciacquo, orientare il getto d'acqua sul vetrino al di sopra del bordo sfumato. Sciacquare il vetrino su entrambi i lati.

I risultati si basano in una certa misura su un'interpretazione soggettiva. I singoli laboratori devono stabilire i propri valori limite.

Note

Gli utenti che usano i kit Sigma 390A e 91C devono prestare attenzione nell'utilizzo di TRIZMA® Buffer Concentrate, N. di cat. 913 e 903C, perché non sono intercambiabili. L'uso del tampone sbagliato provocherà una reazione negativa.

Procedura

Le procedure descritte vengono eseguite a 37 °C.

Procedura per naftolo AS-D cloroacetato esterasi

1. Preriscaldare una quantità di acqua deionizzata sufficiente per l'uso del substrato a 37 °C. Controllare la temperatura prima dell'uso.
2. Immediatamente prima della fissazione, versare 1 ml di soluzione di nitrito di sodio e 1 ml di soluzione Fast Red Violet LB Base in una provetta. Mescolare delicatamente per inversione e lasciare riposare per 2 minuti. Evitare l'evoluzione attiva di bolle d'aria.
3. Aggiungere la soluzione preparata come indicato al punto 2 a 40 ml di acqua deionizzata preriscaldata al punto 1.
4. Aggiungere 5 ml di TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate. (Fare riferimento alla "Nota")
5. Aggiungere 1 ml di soluzione di naftolo AS-D cloroacetato. La soluzione dovrebbe diventare rossa. Mescolare bene e versare in una vaschetta tipo Coplin.
6. Portare la soluzione di citrato-acetone-formaldeide (CAF) a temperatura ambiente (18-26 °C). Fissare i vetrini immergendoli nella soluzione CAF per 30 secondi.
7. Sciacquare accuratamente i vetrini con acqua corrente deionizzata per 45-60 secondi, quindi immergerli nella soluzione ottenuta al punto 5. Non far asciugare i vetrini.
8. Incubare per 15 minuti, a 37 °C, al riparo dalla luce.
9. Trascorsi 15 minuti, prelevare i vetrini e sciacquarli accuratamente con acqua deionizzata per almeno 2 minuti.
10. Controcolorarli nella soluzione di ematossilina di Gill, N. 3 per 2 minuti.
11. Sciacquare in acqua deionizzata e asciugarli all'aria.
12. Esaminare al microscopio. Se è necessario applicare vetrini coprioggetto, utilizzare solo un mezzo di montaggio acquoso.

Note

- Se si usano le vaschette di tipo Columbia, dividere i volumi dei reagenti per 5.
- Se il substrato (fare riferimento al punto 5) appare torbido, portarlo a temperatura ambiente (18-26 °C) e mescolare bene.
- Se i vetrini sono stati prefissati e conservati, saltare la fissazione (punti 6 e 7) e iniziare la colorazione dei vetrini asciutti, prefissati al punto 8.

Procedura per α-naftil acetato esterasi

1. Preriscaldare una quantità di acqua deionizzata sufficiente per l'uso del substrato a 37 °C. Controllare la temperatura prima dell'uso.
2. Immediatamente prima della fissazione, versare 1 ml di soluzione di nitrito di sodio e 1 ml di soluzione Fast Blue BB Base in una provetta. Mescolare per inversione e lasciare riposare per 2 minuti. Il colore cambierà da marrone scuro a giallo intenso. Evitare l'evoluzione attiva di bolle d'aria.
3. Aggiungere la soluzione preparata come indicato al punto 2 a 40 ml di acqua deionizzata preriscaldata al punto 1.
4. Aggiungere 5 ml di TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate.
5. Aggiungere 1 ml di soluzione di α-naftil acetato. La soluzione dovrebbe assumere un colore verdastro. Mescolare bene e versare in una vaschetta tipo Coplin.
6. Portare la soluzione di citrato-acetone-formaldeide (CAF) a temperatura ambiente (18-26 °C). Fissare i vetrini immergendoli nella soluzione CAF per 30 secondi. Negli ultimi 5 secondi agitare vigorosamente i vetrini.
7. Sciacquare accuratamente i vetrini con acqua corrente deionizzata per 45-60 secondi, quindi immergerli nella soluzione ottenuta al punto 5. Non far asciugare i vetrini.
8. Incubare per 30 minuti, a 37 °C, al riparo dalla luce.
9. Trascorsi 30 minuti, prelevare i vetrini e sciacquarli accuratamente con acqua deionizzata per almeno 2 minuti.
10. Controcolorarli nella soluzione di ematossilina di Gill, N. 3 per 2 minuti.
11. Sciacquare in acqua deionizzata e asciugarli all'aria.
12. Esaminare al microscopio. Se è necessario applicare vetrini coprioggetto, utilizzare solo un mezzo di montaggio acquoso.

Note

- Se si usano le vaschette di tipo Columbia, dividere i volumi dei reagenti per 5.
- Se il substrato (fare riferimento al punto 5) appare torbido, portarlo a temperatura ambiente (18-26 °C) e mescolare bene.
- Se i vetrini sono stati prefissati e conservati, saltare la fissazione (punti 6 e 7) e iniziare la colorazione dei vetrini asciutti, prefissati al punto 8.

Procedura per l'esterasi con doppia colorazione

1. Eseguire il test per α-naftil acetato esterasi come descritto nella sezione Procedura. Non controcolorare.
2. Sciacquare i vetrini in acqua deionizzata per 5 minuti.
3. Eseguire il test per naftolo AS-D cloroacetato esterasi come descritto nei punti 1-12 della Procedura. Tralasciare il punto 6.

Note

Usare la soluzione Fast Blue BB Base al posto della soluzione Fast Red Violet LB Base se si preferisce la granulazione blu per naftolo AS-D cloroacetato esterasi.

Procedura per α-naftil acetato esterasi e inibizione con fluoruro

Sebbene l'α-naftil acetato esterasi si trovi principalmente nelle cellule della linea monocitica quando eseguita come descritto, va precisato che i megacariociti e i precursori eritroidi sono positivi per questo enzima.¹¹ Anche i linfociti e alcuni granulociti maturi rivelano una positività occasionale.⁴ Per differenziare definitivamente queste cellule dai monociti, il sistema di incubazione include il fluoruro di sodio. L'enzima rilasciato dai monociti viene inattivato in presenza di questo composto.¹² Per eseguire il test di inibizione con fluoruro è possibile utilizzare la seguente procedura.

1. Versare 2 ml di soluzione di nitrito di sodio in 2 ml di soluzione Fast Blue BB Base. Mescolare piano per inversione. Lasciare riposare per 2 minuti.
2. Contrassegnare due becher con un'etichetta riportante rispettivamente A e B e procedere come segue:

	Becher A	Becher B
Acqua deionizzata, preriscaldata a 37 °C	40 ml	40 ml
Fast Blue BB diazotato ottenuto al punto 1	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7.6 Concentrate	5 ml	5 ml
Soluzione di α-naftil acetato	1 ml	1 ml
Soluzione di fluoruro di sodio	-	1 ml

3. Mescolare bene e versare nelle vaschette tipo Coplin etichettate A e B.
4. Procedere come descritto ai punti 6-12 della Procedura per α-naftil acetato esterasi.

Caratteristiche prestazionali

Metodo di valutazione

Eseguire la scansione dello striscio e selezionare un'area sottile con pochi eritrociti. Le sedi dell'attività di naftolo AS-D cloroacetato esterasi appariranno sotto forma di granulazione di colore rosso vivo, quelle di attività di α-naftil acetato esterasi sotto forma di granulazione di colore nero. Assegnare un punteggio da 0 a 4+ in funzione della quantità e dell'intensità dei singoli coloranti riscontrabili all'interno del citoplasma dei rispettivi tipi di cellule. Le caratteristiche della valutazione si basano in una certa misura su un'interpretazione soggettiva. Un esempio di punteggio suggerito è riportato nella Tabella 1. Le conclusioni si concentrano sulla relativa presenza o assenza di colorazione.

Tabella 1. Caratteristiche del punteggio

Valutazione per cellula	Intensità della colorazione	Interpretazione
0+	Ness.	-
1+	Da debole a moderata	±
2+	Da moderata a forte	+
3+	Forte	+
4+	Brillante	+

Osservazioni attese

Naftolo AS-D cloroacetato esterasi

(Fast Red Violet LB) – In genere questo enzima è considerato specifico per le cellule della linea granulocitica. Le sedi di attività mostrano una granulazione di colore rosso vivo. L'attività è debole o assente nei monociti e linfociti.

α-naftil acetato esterasi

(Fast Blue BB) – Si rileva quest'enzima principalmente nei monociti, macrofagi e istiociti, mentre è praticamente assente nei granulociti. I monociti dovrebbero evidenziare una granulazione di colore nero. Talvolta i linfociti possono mostrare un'attività enzimatica.

Esterasi con doppia colorazione

I campioni prelevati con la procedura con doppia colorazione consentiranno di dimostrare la presenza di granulociti con granulazione di colore rosso e di monociti con granulazione di colore nero.

α-naftil acetato esterasi e inibizione con fluoruro

Tutte le cellule della linea monocitica saranno negative per l'attività enzimatica, ad eccezione degli istiociti differenziati o dei macrofagi specializzati in tessuti che possono anche essere resistenti al fluoruro di sodio.¹⁰

Controllo di qualità

Controllare il sistema di reagenti facendo uso di vetrini di controllo positivi e negativi.

I vetrini di controllo positivi possono essere preparati da specifiche linee cellulari notoriamente positive.

In alternativa, è possibile utilizzare anche sangue coagulato derivante da campioni normali (preferibilmente con innalzamento della conta dei monociti se si utilizza la procedura per α-naftil acetato esterasi); tuttavia, daranno una colorazione meno intensa e avranno meno cellule positive.

Come controllo negativo si possono usare vetrini di pazienti negativi noti. Se non disponibili, la colorazione di un campione in una miscela per incubazione senza substrato darà i risultati desiderati. Tuttavia, si raccomanda vivamente di utilizzare la prima opzione.

Se i risultati osservati differiscono dai risultati attesi, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica di Sigma-Aldrich.

Caratteristiche di prestazione analitica

I risultati delle prestazioni analitiche per i test dati condotti su tutte le strutture target confermano una sensibilità, specificità e ripetibilità del 100%.

N. di cat.	Descrizione del prodotto	Target	Specificità intra-saggio	Sensibilità intra-saggio	Specificità inter-saggio	Sensibilità inter-saggio
911	Soluzione di naftolo AS-D cloroacetato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
912	Soluzione Fast Red Violet LB Base	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
913	TRIZMAL™ 6.3 Concentrate	Osmolalità	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
		pH	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
914	Soluzione di nitrato di sodio	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
915	Soluzione di citrato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
916	Soluzione di α-naftil acetato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
917	Soluzione Fast Blue BB Base	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
918	TRIZMAL™ 7.6 Concentrate	Osmolalità	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
		pH	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
919	Soluzione di fluoruro di sodio	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
GHS3	Soluzione di ematossilina di Gill, N. 3	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3

Avvertenze e pericoli

Per informazioni aggiornate su rischi, precauzioni e sicurezza, consultare la scheda dati di sicurezza e l'etichetta del prodotto.

91A:



H226 Liquido e vapore infiammabili.

H290 Può essere corrosivo per i metalli.

H301 Tossico se ingerito.

H312 + H332 Nocivo per contatto con la pelle o se inalato.

H319 Provoca grave irritazione oculare.

H370 Provoca danni agli organi (occhi, sistema nervoso centrale).

H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme o altre fonti di innesco. Non fumare.

P273 Non disperdere nell'ambiente.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

P301 + P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P303 + P361 + P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua.

P304 + P340 + P312 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

91C:



- H290 Può essere corrosivo per i metalli.
- H302 Nocivo se ingerito.
- H315 Provoca irritazione cutanea.
- H317 Può provocare una reazione cutanea allergica.
- H318 Provoca gravi lesioni oculari.
- H335 Può irritare le vie respiratorie.
- H360FD Può nuocere alla fertilità Può nuocere al feto.
- H373 Può provocare danni agli organi (reni) in caso di esposizione prolungata o ripetuta, se ingerito.
- P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le precauzioni di sicurezza.
- P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.
- P301 + P312 IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
- P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.
- P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
- P308 + P313 In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un medico.

Se durante l'utilizzo di questo dispositivo, o a seguito di questo, si è verificato un grave incidente, segnalarlo al fabbricante e/o al suo rappresentante autorizzato e alla propria autorità nazionale.

Definizioni dei simboli

Simboli da usare in conformità con la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabbricante		Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Codice del lotto
	Mandatario nella Comunità europea/Unione europea		Dichiarazione di conformità dell'Unione europea (definita in IVDR 2017/746)
	Data di scadenza		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Limite di temperatura		Attenzione
	Data di fabbricazione		Importatore
	Mandatario in Svizzera		

Bibliografia

1. Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974.
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975.
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972.
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971.
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974.
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957.
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113.
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130.
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38.
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111.
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.

Recapiti

Per effettuare un ordine, visitare il nostro sito web all'indirizzo [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Per il servizio di assistenza tecnica, visitare l'apposita pagina dedicata sul nostro sito web all'indirizzo [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Cronologia delle revisioni

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Trasferito a un nuovo modello con il marchio attuale. Specificato "per uso professionale" nelle sezioni "Uso previsto" e "Precauzioni". Modificata la sezione "Uso previsto" per allinearla alle linee guida dell'IVDR. Modificato "scheda dati di sicurezza dei materiali" in "scheda dati di sicurezza". Aggiornati i recapiti. Eliminate le istruzioni per conformarsi allo standard CLSI per la raccolta dei campioni. Sostituita l'indicazione della norma EN 980 con quella della norma EN ISO 15223-1:2021 per i simboli. Aggiunti recapiti da contattare in caso di eventi avversi. Aggiornata la bibliografia. Aggiunta la cronologia delle revisioni. Aggiunta la sezione "Avvertenze e pericoli". Aggiunta informazione per Mandatario in Svizzera.

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

L'iniziale "M" e Sigma-Aldrich sono marchi commerciali di Merck KGaA, Darmstadt, Germania o delle sue affiliate. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi proprietari. Informazioni dettagliate sui marchi sono disponibili tramite risorse accessibili pubblicamente.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Instrucciones de uso

Acetato de α-naftil leucocitario (esterasa no específica) y cloroacetato de naftol AS-D leucocitario (esterasa específica)

Procedimiento n.º 91

IVD

CE

Millipore
Sigma

Uso previsto

Los kits de α-naftil acetato esterasa y de naftol AS-D cloroacetato esterasa Sigma-Aldrich están diseñados para su uso general como tinción histológica en laboratorios. Los reactivos de α-naftil acetato esterasa y de naftol AS-D cloroacetato esterasa se destinan exclusivamente a "uso diagnóstico in vitro" profesional. Este procedimiento histoquímico, cualitativo y manual detecta la actividad de la α-naftil acetato esterasa y de la naftol AS-D cloroacetato esterasa en los leucocitos en sangre, láminas de médula ósea o improntas de tejidos humanas. La visualización histológica de las esterasas celulares de leucocitos representa una técnica única en la actualidad y es comúnmente utilizada en medicina.

Las esterasas celulares son ubicuas y parecen representar una serie de enzimas diferentes que actúan sobre sustratos seleccionados. En condiciones de reacción definidas, puede ser posible determinar los tipos de células hemopoyéticas, utilizando sustratos específicos de esterasas. Los métodos descritos proporcionan a los hematólogos y hematopatólogos medios para distinguir los granulocitos de los monocitos.¹⁻⁷

Para realizar la prueba, se incubaba la sangre, las láminas de médula ósea o las preparaciones de improntas citológicas de tejido con cloroacetato de naftol AS-D (NCAE) o α-naftil acetato (NAE) en presencia de una sal de diazonio recién formada. La hidrólisis enzimática de los enlaces éster libera compuestos de naftol libres. Estos se acoplan con la sal de diazonio, formando depósitos muy coloreados en los lugares de actividad de la enzima.

La mayoría de los procedimientos recientes, incluidos los proporcionados por Sigma-Aldrich, emplean sales de diazonio estables. Se forman haciendo reaccionar una ariamina con nitrato de sodio en un medio ácido.⁸ El cloruro de diazonio resultante (normalmente inestable) puede tratarse entonces con compuestos como el cloruro de zinc, el sulfato de zinc o el naftaleno-1,6-disulfonato, formando sales estables. Estos estabilizadores pueden ejercer una marcada inhibición sobre algunos sistemas enzimáticos, mientras que los cloruros de diazonio son menos inhibidores.⁸ Por esta razón, Sigma-Aldrich proporciona ahora una solución estable de base Fast Red Violet LB, base Fast Blue BB, y nitrato de sodio para la citología de la esterasa. Para simplificar aún más estos métodos, se incluyen soluciones estables de cloroacetato de naftol AS-D y de α-naftil acetato. La disponibilidad de estas soluciones estables permiten al cliente ajustar los volúmenes de reactivos de trabajo según las necesidades, eliminando los residuos.

Reactivos

Solución de cloroacetato de naftol AS-D (N.º de cat. 911-10ML)

Cloroacetato de naftol AS-D, 8 mg/ml, y estabilizador. Advertencia. Provoca irritación ocular. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando.

Solución de base Fast Red Violet LB (N.º de cat. 912-10ML)

Base Fast Red Violet LB, 15 mg/ml, en 0,4 mol/l de ácido clorhídrico con estabilizador. Peligro. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

Concentrado TRIZMAL™ 6.3 (N.º de cat. 913-50ML)

Maleato TRIZMA®, 1 mol/l, con tensioactivo. pH 7,6 ± 0,15 a 25 °C. Peligro. Provoca irritación cutánea. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Provoca lesiones oculares graves. Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

Solución de nitrato de sodio (N.º de cat. 914-10ML)

Nitrato de sodio, 0,1 mol/l.

Solución de citrato (N.º de cat. 915-50ML)

Ácido cítrico, 18 mmol/l, citrato de sodio, 9 mmol/l, cloruro de sodio, 12 mmol/l, con tensioactivo, pH 3,6 ± 0,1 a 25 °C.

Solución de α-naftil acetato (N.º de cat. 916-10ML)

α-naftil acetato, 12,5 mg/ml, en solución de metanol con estabilizadores. Peligro. Líquido y vapores inflamables. Tóxico en caso de ingestión. Nocivo en contacto con la piel o si se inhala. Provoca una leve irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Provoca daños en los órganos.

Solución de base Fast Blue BB (N.º de cat. 917-10ML)

Base Fast Blue BB, 15 mg/ml, C.I. 37175, en 0,4 mol/l de ácido clorhídrico, con estabilizadores. Advertencia. Nocivo en caso de ingestión. Provoca una leve irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil.

Concentrado TRIZMAL™ 7.6 (N.º de cat. 918-50ML)

Maleato TRIZMA®, 1 mol/l, con tensioactivo. pH 7,6 ± 0,15 a 25 °C. Peligro. Provoca irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias si se inhala. Puede irritar las vías respiratorias. Nocivo para los organismos acuáticos.

Solución de hematoxilina Gill N.º 3 (N.º de cat. GHS3-50ML)

Hematoxilina certificada, 6,0 g/l, C.I. 75290, yodato sódico, 0,6 g/l y sulfato de aluminio, 52,8 g/l con estabilizantes. Peligro. Nocivo en caso de ingestión. Provoca lesiones oculares graves. Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

Solución de fluoruro de sodio (N.º de cat. 919-25ML)

Fluoruro de sodio, 20 g/l. Advertencia. Nocivo en caso de ingestión. Provoca una leve irritación cutánea.

Material especial necesario pero no suministrado

- Acetona, reactivo ACS
- Formaldehído al 37 %, ACS
- Solución de fluoruro de sodio, N.º de cat. 919-25ML (necesario para la α-naftil acetato esterasa con procedimiento de inhibición de fluoruro).

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar la solución de hematoxilina Gill N.º 3 a temperatura ambiente (18-26 °C) protegida de la luz. Conservar los demás reactivos en el frigorífico (2-8 °C).

El concentrado TRIZMAL™ 6.3, el concentrado TRIZMAL™ 7.6 y la solución de citrato son adecuados para su uso en ausencia de crecimiento microbiano. Los demás reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

Deterioro

Desechar el concentrado TRIZMAL™ y la solución de citrato si es evidente el crecimiento microbiano. Desechar la solución de hematoxilina Gill N.º 3 si se vuelve marrón (sobreoxidación por aire) o púrpura (pérdida de acidez).

Preparación

Calentar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-26 °C) antes de su uso. Los reactivos de esterasa se suministran listos para su uso.

Fijador de citrato-acetona-formaldehído: A 25 ml de solución de citrato, añadir 65 ml de acetona y 8 ml de formaldehído al 37 %. Colocar en un frasco de vidrio y tapar bien. Conservar en el frigorífico (2-8 °C). Estabilizar a temperatura ambiente (18-26 °C) antes de su uso. Estable hasta 4 semanas si se almacena bien tapado en el frigorífico.

Precauciones

Los dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (DMDIV) incluidos en estos kits están destinados a un uso de diagnóstico in vitro en un entorno de laboratorio clínico. Estos DMDIV están destinados a un uso profesional por parte de personal cualificado. El personal de laboratorio capacitado de Sigma-Aldrich puede utilizar los DMDIV para manipular muestras humanas que puedan ser infecciosas, utilizar microscopios y otros equipos de laboratorio y tener percepción de los colores y agudeza visual para distinguir los colores y otros objetos bajo el microscopio.

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Se deben eliminar los residuos respetando todas las normativas locales, estatales, regionales o nacionales.

Procedimiento

Recogida de la muestra

Ningún método de prueba conocido puede ofrecer total garantía de que las muestras de sangre o tejidos no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

La sangre, las láminas de médula ósea, las preparaciones de improntas citológicas tisulares y las preparaciones de citocentrífuga pueden utilizarse tanto con la α-naftil acetato esterasa como con la naftol AS-D cloroacetato esterasa. El EDTA o la heparina servirán como anticoagulante.⁹ Los tejidos congelados e incluidos en parafina pueden utilizarse con la naftol AS-D cloroacetato esterasa. La α-naftil acetato esterasa puede utilizarse con éxito en secciones de tejido congeladas.¹⁰ Las láminas de sangre o de médula ósea pueden almacenarse fijadas a temperatura ambiente (18-26 °C) durante varias semanas o sin fijar durante varios días sin que se produzcan cambios apreciables en la actividad.^{4,9} No enviar sangre entera para su análisis en otros laboratorios. Enviar portaobjetos fijados o no fijados. Los portaobjetos deben mantenerse frescos durante el transporte. Dejar que las láminas se sequen al menos 1 hora antes de la fijación.

Limitaciones del procedimiento

Los procedimientos descritos se realizan a 37 °C. Si los reactivos no están a esta temperatura, se pueden obtener reacciones débiles o negativas. Se recomienda comprobar las temperaturas con un termómetro preciso. Los baños de agua a temperatura controlada son más eficaces que las incubadoras de aire caliente y deberían utilizarse para los métodos de citología enzimática. La transferencia de calor a través del vidrio es más rápida que a través del plástico, por lo que deben emplearse frascos Coplin de vidrio.

Muchos sistemas enzimáticos son sensibles a trazas mínimas de detergente. El lavado de la cristalería con lejía diluida, seguido de un aclarado con abundante agua desionizada, evitará el efecto del detergente sobre las enzimas celulares.

El sistema de fijación descrito en la sección "Reactivos" contiene formaldehído. Si el fijador no se elimina por completo mediante un enjuague enérgico, cualquier cantidad de aldehído, ya sea concentrada en los portaobjetos secados al aire o en cantidades mínimas de los portaobjetos húmedos, que se añada al sistema de incubación puede provocar la inhibición de las enzimas. Para evitar la pérdida de la lámina de sangre durante el proceso de enjuague, dirija el chorro de agua hacia el portaobjetos por encima del canto biselado. Aclarar ambos lados del portaobjetos.

Los resultados se basan en un cierto grado de interpretación subjetiva. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos normales.

Notas

Los usuarios de los kits Sigma 390A y 91C deben tener cuidado al utilizar los concentrados de amortiguador TRIZMA®, números de catálogo 913 y 903C, ya que no son intercambiables. El uso de una solución amortiguadora incorrecta dará lugar a una reacción negativa.

Procedimiento

Los procedimientos descritos se realizan a 37 °C.

Procedimiento de naftol AS-D cloroacetato esterasa

1. Precalentar suficiente agua desionizada para el uso del sustrato a 37 °C. Comprobar la temperatura antes de usarla.
2. Inmediatamente antes de la fijación, añadir 1 ml de solución de nitrato de sodio a 1 ml de solución base Fast Red Violet LB en un tubo de ensayo. Mezclar suavemente por inversión y dejar reposar 2 minutos. Debe evitarse la evolución activa de burbujas de gas.
3. Añadir la solución del paso 2 a 40 ml de agua desionizada precalentada del paso 1.
4. Añadir 5 ml de concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 6.3 (Ver "Nota").
5. Añadir 1 ml de solución de cloroacetato de naftol AS-D. La solución debe volverse roja. Mezclar bien y verter en el frasco Coplin.
6. Llevar la solución de citrato-acetona-formaldehído (CAF) hasta la temperatura ambiente (18-26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en la solución CAF durante 30 segundos.
7. Enjuagar los portaobjetos a fondo en agua desionizada corriente durante 45-60 segundos, y luego colocarlos en la solución del paso 5. No dejar que los portaobjetos se sequen.
8. Incubar durante 15 minutos, a 37 °C protegido de la luz.
9. Después de 15 minutos, retirar los portaobjetos y enjuagarlos a fondo en agua desionizada durante al menos 2 minutos.
10. Contrateñir 2 minutos con solución de hematoxilina Gill N.º 3.
11. Aclarar con agua del grifo y dejar secar al aire.
12. Evaluar al microscopio. Si se requiere un cubreobjetos, utilizar únicamente un medio de montaje acuoso.

Notas

- Para usar con los frascos Columbia, dividir los volúmenes de reactivos entre 5.
- Si el sustrato (véase el paso 5) aparece turbio, llevarlo a temperatura ambiente (18-26 °C) y mezclar bien.
- Si los portaobjetos han sido prefijados y almacenados, omitir la fijación (pasos 6 y 7) y comenzar la tinción de los portaobjetos secos y prefijados en el paso 8.

Procedimiento de la α-naftil acetato esterasa

1. Precalentar suficiente agua desionizada para el uso del sustrato a 37 °C. Comprobar la temperatura antes de usarla.
2. Inmediatamente antes de la fijación, añadir 1 ml de solución de nitrito de sodio a 1 ml de solución base Fast Blue BB en un tubo de ensayo. Mezclar por inversión y dejar reposar al menos 2 minutos. El color cambiará de marrón sucio a amarillo intenso. Debe evitarse la evolución activa de burbujas de gas.
3. Añadir la solución del paso 2 a 40 ml de agua desionizada precalentada del paso 1.
4. Añadir 5 ml de concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 7.6.
5. Añadir 1 ml de solución de α-naftil acetato. La solución debe volverse verdosa. Mezclar bien y verter en el frasco Coplin.
6. Llevar la solución de citrato-acetona-formaldehído (CAF) hasta la temperatura ambiente (18-26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en la solución CAF durante 30 segundos. Agitar enérgicamente los portaobjetos durante los últimos 5 segundos.
7. Enjuagar los portaobjetos a fondo en agua desionizada corriente durante 45-60 segundos, y luego colocarlos en la solución del paso 5. No dejar que los portaobjetos se sequen.
8. Incubar durante 30 minutos, a 37 °C protegido de la luz.
9. Después de 30 minutos, retirar los portaobjetos y enjuagarlos a fondo durante al menos 2 minutos en agua desionizada corriente.
10. Contrateñir 2 minutos con solución de hematoxilina Gill N.º 3.
11. Aclarar con agua del grifo y dejar secar al aire.
12. Evaluar al microscopio. Si se requiere un cubreobjetos, utilizar únicamente un medio de montaje acuoso.

Notas

- Para usar con los frascos Columbia, dividir los volúmenes de reactivos entre 5.
- Si el sustrato (véase el paso 5) aparece turbio, llevarlo a temperatura ambiente (18-26 °C) y mezclar bien.
- Si los portaobjetos han sido prefijados y almacenados, omitir la fijación (pasos 6 y 7) y comenzar la tinción de los portaobjetos secos y prefijados en el paso 8.

Procedimiento de tinción doble con esterasa

1. Realice la prueba de α-naftil acetato esterasa como se describe en el procedimiento. No hacer contratinción.
2. Aclarar el portaobjetos 5 minutos en agua desionizada.
3. Realizar la prueba de la naftol AS-D cloracetato esterasa como se describe en los pasos 1-12 del procedimiento. Omitir el paso 6.

Nota

La solución base Fast Blue BB puede ser sustituida por la solución base Fast Red Violet LB si se prefiere la granulación azul para la naftol AS-D cloroacetato esterasa.

Procedimiento de inhibición de α-naftil acetato esterasa con fluoruro

Aunque la α-naftil acetato esterasa se encuentra principalmente en células de linaje monocítico cuando se realiza como se describe, debe reconocerse que los megacariocitos y los precursores eritroides son positivos para esta enzima.¹¹ Los linfocitos y algunos granulocitos maduros también muestran una positividad ocasional.⁴ Para diferenciar estas células de forma concluyente de los monocitos, se incorpora fluoruro de sodio al sistema de incubación. La enzima monocítica se inactiva en presencia de este compuesto.¹² Puede utilizarse el siguiente procedimiento para realizar la prueba de inhibición de fluor.

1. A 2 ml de solución base Fast Blue BB, añadir 2 ml de solución de nitrito de sodio. Mezclar suavemente por inversión. Dejar reposar durante 2 minutos.
2. Rotular dos vasos de precipitados con A y B y añadir lo siguiente:

	Vaso A	Vaso B
Agua desionizada, precalentada a 37 °C	40 ml	40 ml
Fast Blue diazotizado BB del paso 1	2 ml	2 ml
Concentrado TRIZMAL™ 7.6	5 ml	5 ml
Solución de α-naftil acetato	1 ml	1 ml
Solución de fluoruro de sodio	-	1 ml

3. Mezclar bien y verter en los frascos Coplin etiquetados como A y B.
4. Proceder como se describe en los pasos 6-12 del procedimiento de la α-naftil acetato esterasa.

Características de funcionamiento

Método de puntuación

Explorar la lámina y seleccionar una zona fina con pocos eritrocitos. Los sitios de actividad de la naftol AS-D cloracetato esterasa aparecerán como una granulación de color rojo brillante, la α-naftil acetato esterasa como una granulación negra. Clasificar de 0 a 4+ en función de la cantidad e intensidad de cada colorante precipitado en el citoplasma de los respectivos tipos de células. Las características de la puntuación se basan en cierta medida en la interpretación subjetiva. En la tabla 1 se sugiere un formato de puntuación. Las conclusiones se centran en la presencia o ausencia relativa de tinción.

Tabla 1. Características de la puntuación

Clasificación de las células	Intensidad de la tinción	Interpretación
0+	Ninguno	–
1+	De débil a moderada	±
2+	De moderada a fuerte	+
3+	Fuerte	+
4+	Brillante	+

Observaciones previstas

Naftol AS-D cloracetato esterasa

(Fast Red Violet LB) - La enzima suele considerarse específica para las células de linaje granulocítico. Los lugares de actividad muestran una granulación de color rojo brillante. La actividad es débil o ausente en los monocitos y linfocitos.

α-naftil acetato esterasa

(Fast Blue BB) - La enzima se detecta principalmente en monocitos, macrófagos e histiocitos, y está prácticamente ausente en los granulocitos. Los monocitos deben mostrar una granulación negra. Los linfocitos pueden mostrar ocasionalmente actividad enzimática.

Tinción doble con esterasa

Las muestras tomadas mediante el procedimiento de tinción doble demostrarán los granulocitos con granulación roja y los monocitos con granulación negra.

Inhibición de la α-naftil acetato esterasa con fluoruro.

Todas las células de linaje monocítico serán negativas para la actividad enzimática, a excepción de los histiocitos diferenciados o los macrófagos especializados en el tejido, que también pueden ser resistentes al fluoruro de sodio.¹⁰

Control de calidad

El sistema de reactivos debe supervisarse mediante el uso de portaobjetos de control positivo y negativo.

Las preparaciones de control positivo pueden prepararse a partir de líneas celulares específicas que se sabe que son positivas.

Alternativamente, también se puede utilizar sangre anticoagulada de muestras normales (preferiblemente con un recuento elevado de monocitos si se utiliza el procedimiento de la α-naftil acetato esterasa); sin embargo, proporcionarán una tinción menos intensa y tendrán menos células positivas.

Los portaobjetos negativos conocidos de los pacientes pueden utilizarse como control negativo. Si no está disponible, la tinción de una muestra en una mezcla de incubación con el sustrato omitido dará los resultados deseados. Sin embargo, el uso de lo primero es muy recomendable.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio técnico de Sigma-Aldrich.

Características de funcionamiento analítico

Los resultados del funcionamiento analítico de las pruebas realizadas en todas las estructuras objetivo confirman una sensibilidad, especificidad y repetibilidad del 100 %.

N.º de cat.	Descripción del producto	Objetivo	Especificidad intraensayo	Sensibilidad intraensayo	Especificidad interensayo	Sensibilidad interensayo
911	Añadir solución de cloroacetato de naftol AS-D.	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
912	Solución de base Fast Red Violet LB	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
913	Concentrado TRIZMAL™ 6.3	Osmolalidad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
		pH	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
914	Solución de nitrito	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
915	Solución de citrato	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
916	Solución de α-naftil acetato	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
917	Solución de base Fast Blue BB	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
918	Concentrado TRIZMAL™ 7.6	Osmolalidad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
		pH	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
919	Solución de fluoruro de sodio	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
GHS3	Solución de hematoxilina Gill n.º 3	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Advertencias y peligros

Consulte la ficha de seguridad y el etiquetado del producto para obtener información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

91A:



H226 Líquido y vapores inflamables.

H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H301 Tóxico en caso de ingestión.

H312 + H332 Nocivo en contacto con la piel o si se inhala.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H370 Provoca daños en los órganos (ojos, sistema nervioso central).

H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P210 Mantener alejado del calor, superficies calientes, chispas, llamas al descubierto y otras fuentes de ignición. No fumar.

P273 No dispersar en el medio ambiente.

P280 Usar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.

P301 + P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.

P304 + P340 + P312 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si la persona no se encuentra bien.

91C:



- H290 Puede ser corrosivo para los metales.
- H302 Nocivo en caso de ingestión.
- H315 Provoca irritación cutánea.
- H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
- H318 Provoca lesiones oculares graves.
- H335 Puede irritar las vías respiratorias.
- H360FD Puede perjudicar la fertilidad. Puede dañar al feto.
- H373 Puede provocar daños en los órganos (riñón) tras exposiciones prolongadas o repetidas en caso de ingestión.
- P202 No manipular antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.
- P280 Usar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.
- P301 + P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si la persona no se encuentra bien.
- P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
- P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando.
- P308 + P313 En caso de exposición demostrada o supuesta: Buscar ayuda médica.

Si durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se produce un incidente grave, infórmelo al fabricante o a su representante autorizado y a su autoridad nacional.

Definiciones de los símbolos

Símbolos definidos en la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar instrucciones de uso		Código de lote
	Representante autorizado en la Comunidad Europea/Unión Europea		Declaración UE de conformidad (definida en el Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro)
	Fecha de caducidad		Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura		Precaución
	Fecha de fabricación		Importador
	Representante autorizado en Suiza		

Referencias

- Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974.
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975.
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972.
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971.
- Yam, LT, Li CY, Wolfe HJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957.
- Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127-130.
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Información de contacto

Para hacer un pedido, visite nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para solicitar el Servicio técnico, visite la página de servicio técnico en nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historial de revisiones

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Transferido a la nueva plantilla con la marca actual. Especificado para uso profesional en uso previsto y precauciones. Uso previsto revisado para ajustarse a las directrices del Reglamento sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Se ha actualizado la ficha de datos de seguridad del material a la ficha de datos de seguridad. Se ha actualizado la información de contacto. Se ha eliminado la instrucción de seguir el CLSI para la recogida de muestras. Se ha eliminado la norma EN 980 y se ha cambiado a la norma EN ISO 15223-1:2021 en los símbolos. Se ha añadido la información de contacto en caso de acontecimientos adversos. Se han actualizado las referencias bibliográficas. Se ha añadido una tabla del historial de revisiones. Se han añadido advertencias y peligros.Información del CH-REP añadida.	



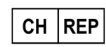
Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Brugsanvisning

Leukocyt- α -naphthylacetat (uspecifik esterase)- og leukocyt-naphthol-AS-D-chloroacetat (specifik esterase)-sæt

Procedure nr. 91



Tilsigtet brug

Sigma-Aldrich naphthol-AS-D-chloroacetatesterase- og α -naphthylacetatesterase-sæt er beregnet til brug som en histologisk farvning til almindelig laboratoriebrug. Naphthol-AS-D-chloroacetatesterase- og α -naphthylacetatesterase-reagenser er udelukkende beregnet til professionel "in vitro-diagnostisk brug". Denne manuelle, kvalitative, histokemiske procedure påviser naphthol-AS-D-chloroacetatesterase- og α -naphthylacetatesterase-aktivitet i leukocyter i blod, knoglemarvsfilm eller vævsberøringspræparater fra mennesker. Histologisk visualisering af cellulære esteraser i leukocyter er en unik teknik, som aktuelt finder bred anvendelse på det medicinske område.

Cellulære esteraser er allestedsnærværende og repræsenterer tilsyneladende en række forskellige enzymer, der reagerer på udvalgte substrater. Under definerede reaktionsbetingelser kan det være muligt at bestemme hæmopoietiske celletyper ved anvendelse af specifikke esterase-substrater. De beskrevne metoder giver hæmatologer og hæmatopatologer mulighed for at skelne granulocytter fra monocytter.¹⁻⁷

Testen udføres ved at inkubere blod, knoglemarvsfilm eller vævsberøringspræparater med enten naphthol-AS-D-chloroacetat (NCAE) eller α -naphthylacetat (NAE) ved tilstedeværelse af nyligt dannet diazoniumsalt. Enzymatisk hydrolyse af esterbindinger frigiver frie naphtholforbindelser. Disse kobles med diazoniumsaltet og danner kraftigt farvede aflejringer på steder med enzymaktivitet.

De nyeste procedurer, inklusive dem, der leveres af Sigma-Aldrich, anvender stabile diazoniumsalte. Disse dannes ved at lade en arylamin reagere med natriumnitrit i et surt medium.⁸ Det resulterende diazoniumklorid (normalt ustabil) kan derefter behandles med forbindelser såsom zinkklorid, zinksulfat eller naphthalen-1,6-disulfonat, hvorved der dannes stabile salte. Disse stabilisatorer kan udøve en markant hæmning på visse enzymatiske systemer, hvorimod diazoniumkloriderne er mindre hæmmende.⁹ Af denne grund leverer Sigma-Aldrich nu stabile opløsninger af Fast Red Violet LB-base, Fast Blue BB-base og natriumnitrit til esterasecytokemi. For yderligere at forenkle disse metoder er stabile opløsninger af naphthol-AS-D-chloroacetat og α -naphthylacetat inkluderet. Tilgængeligheden af disse stabile opløsninger giver kunden mulighed for at justere arbejdsreagensvolumenen efter behov, hvilket eliminerer spild.

Reagenser

Naphthol-AS-D-chloroacetatopløsning (kat.nr. 911-10ML)

Naphthol-AS-D-chloroacetat, 8 mg/ml, og stabilisator. Advarsel. Forårsager øjenirritation. VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

Fast Red Violet LB-baseopløsning (kat.nr. 912-10ML)

Fast Red Violet LB-base, 15 mg/ml, i 0,4 mol/l saltsyre med stabilisator. Fare. Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader. Bær beskyttelseshandsker/øjenskytelse/ansigtsbeskyttelse.

TRIZMAL™ 6.3-koncentrat (kat.nr. 913-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/l, med overfladeaktivt stof. pH 6,3 $\pm$ 0,15 ved 25 °C. Fare. Forårsager hudirritation. Kan forårsage allergisk hudreaktion. Forårsager alvorlig øjenskade. Bær beskyttelseshandsker/øjenskytelse/ansigtsbeskyttelse.

Natriumnitritopløsning (kat.nr. 914-10ML)

Natriumnitrit, 0,1 mol/l.

Citratopløsning (kat.nr. 915-50ML)

Citronsyre, 18 mmol/l, natriumcitrat, 9 mmol/l, natriumchlorid, 12 mmol/l med overfladeaktivt stof. pH 3,6 $\pm$ 0,15 ved 25 °C.

 α -naphthylacetat-opløsning (kat.nr. 916-10ML)

α -naphthylacetat, 12,5 mg/ml, i methanolopløsning med stabilisatorer. Fare. Brandfarlig væske og damp. Giftig ved indtagelse. Farlig ved hudkontakt eller ved indånding. Forårsager mild hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Forårsager organskader.

Fast Blue BB-baseopløsning (kat.nr. 917-10ML)

Fast Blue BB-base, 15 mg/ml, CI 37175, i 0,4 mol/l saltsyre med stabilisatorer. Advarsel. Farlig ved indtagelse. Forårsager mild hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let.

TRIZMAL™ 7.6-koncentrat (kat.nr. 918-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/l, med overfladeaktivt stof. pH 7,6 $\pm$ 0,15 ved 25 °C. Fare. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenskade. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Kan forårsage irritation af luftvejene. Skadelig for vandlevende organismer.

Hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3 (kat.nr. GHS3-50ML)

Certificeret hæmatoxylin, 6 g/l, CI 75290, natriumiodat, 0,6 g/l, og aluminiumsulfat, 52,8 g/l, med stabilisatorer. Fare. Farlig ved indtagelse. Forårsager alvorlig øjenskade. Bær beskyttelseshandsker/øjenskytelse/ansigtsbeskyttelse.

Natriumfluoridopløsning (kat.nr. 919-25ML)

Natriumfluorid, 20 g/l. Advarsel. Farlig ved indtagelse. Forårsager mild hudirritation.

Særlige materialer, som er påkrævede, men ikke medfølger

- Acetone, ACS-reagens
- Formaldehyd, 37 %, ACS
- Natriumfluoridopløsning, kat.nr. 919-25ML (påkrævet til α -naphthylacetatesterase med fluoridinhibering-proceduren).

Opbevaring og stabilitet

Opbevar hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3 ved stuetemperatur (18-26 °C) beskyttet mod lys. Opbevar andre reagenser i køleskab (2-8 °C).

TRIZMAL™ 6.3-koncentrat, TRIZMAL™ 7.6-koncentrat og citratopløsning er egnede til brug ved fravær af mikrobiel vækst. Andre reagenser er stabile indtil udløbsdatoen på mærkaterne.

Forringelse

TRIZMAL™ koncentrat og citratopløsning skal kasseres, hvis der er tydelig mikrobiel vækst. Hæmatoxylinopløsning Gill nr. 3 skal kasseres, hvis den bliver brun (overoxideret på grund af luft) eller lilla (tab af surhed).

Forberedelse

Opvarm alle reagenser til stuetemperatur (18-26 °C) inden brug. Esterasereagenserne leveres klar til brug.

Citrat-acetone-formaldehydfiksativ: Tilsæt 65 ml acetone og 8 ml 37 % formaldehyd til 25 ml citratopløsning. Anbring i en glasflaske, og stram låget godt til. Opbevares i køleskab (2-8 °C). Bring op på stuetemperatur (18-26 °C) inden brug. Stabil i op til 4 uger ved tæt lukket opbevaring i køleskab.

Forsigtighedsregler

IVD'erne, der er inkluderet i disse sæt, er beregnet til in vitro-diagnostisk brug i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD'er er udelukkende beregnet til professionel brug udført af kvalificeret personale. IVD'er fra Sigma-Aldrich kan benyttes af laboratoriepersonale, som er uddannet til at håndtere potentielt smittefarlige humane prøver, bruge mikroskoper og andet laboratorieudstyr og har en farveopfattelse og synsstyrke, som gør dem i stand til at skelne mellem farver og andre genstande under et mikroskop.

Normale forsigtighedsregler, der iagttages ved håndtering af laboratoriereagenser, skal følges. Bortskaf affald under overholdelse af alle lokale, regionale eller nationale forskrifter.

Procedure

Prøveindsamling

Ingen kendt testmetode kan give fuldstændig sikkerhed for, at blodprøver eller væv ikke overfører smitte. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver betragtes som potentielt smittefarlige.

Blod, knoglemarvsfilm, vævsberøringspræparater og cytoentrifugepræparater kan anvendes med både α -naphthylacetatesterase og naphthol-AS-D-chloroacetatesterase. Enten EDTA eller heparin vil fungere som antikoagulanter.⁹ Frosset og paraffinindlejret væv kan bruges sammen med naphthol-AS-D-chloroacetatesterase. α -naphthylacetatesterase kan med succes anvendes på frosne vævssnit.¹⁰ Blod- eller knoglemarvsfilm kan opbevares fikseret ved stuetemperatur (18-26 °C) i flere uger eller ufikseret i flere dage uden nævneværdig ændring i aktivitet.^{4,9} Send ikke fuldblod til analyse på andre laboratorier. Send fikserede eller ufikserede objektglas. Objektglassene skal opbevares køligt under transport. Lad film tørre i mindst 1 time før fiksering.

Procedurens begrænsninger

De beskrevne procedurer udføres ved 37 °C. Hvis reagenserne ikke har denne temperatur, vil de opnåede reaktioner muligvis være svage eller negative. Det anbefales, at temperaturerne kontrolleres med et nøjagtigt termometer. Vandbade med kontrolleret temperatur er mere effektive end inkubatorer med varm luft og bør bruges til enzymcytokemiske metoder. Varmeeverførsel gennem glas er hurtigere end gennem plastik, og derfor bør der anvendes Coplin-skåle.

Mange enzymssystemer er følsomme over for meget små spor af vaskemiddel. Vask af glasartikler med fortyndet blegemiddel efterfulgt af skylning i rigelige mængder demineraliseret vand vil forhindre, at cellulære enzymer påvirkes af vaskemiddel.

Fiksativsystemet, der er beskrevet i afsnittet "Reagenser", indeholder formaldehyd. Hvis fiksativet ikke fjernes fuldstændigt ved kraftig skylning, kan enhver mængde aldehyd, enten koncentreret på lufttørrede objektglas eller spormængder fra våde objektglas, som tilsættes i inkubationssystemet, resultere i enzymhæmning. For at forhindre tab af blodfilm under skylleprocessen skal vandstrømmen rettes mod objektglasset over fjerkanter. Skyl begge sider af objektglasset.

Resultaterne er baseret på en vis grad af subjektiv fortolkning. De enkelte laboratorier bør etablere deres egne normalområder.

Bemærkninger

Brugere af Sigma-sæt 390A og 91C bør udvise forsigtighed, når de bruger**TRIZMA® bufferkoncentrat katalognr. 913 og 903C, da de ikke er udskiftelige.****Brug af forkert buffer vil resultere i en negativ reaktion.**

Procedure

De beskrevne procedurer udføres ved 37 °C.

Naphthol-AS-D-chloroacetatesterase-procedure

1. Forvarm tilstrækkeligt demineraliseret vand til substratbrug til 37 °C. Kontrollér temperaturen inden brug.
2. Umiddelbart inden fiksering tilsættes 1 ml natriumnitritopløsning til 1 ml Fast Red Violet LB-baseopløsning i et reagensglas. Bland opløsningen forsigtigt ved at vende den op og ned, og lad den stå i 2 minutter. Aktiv udvikling af gasbobler skal undgås.
3. Tilsæt opløsningen fra trin 2 til 40 ml forvarmet, demineraliseret vand fra trin 1.
4. Tilsæt 5 ml TRIZMAL™ 6.3-bufferkoncentrat. (Se "Bemærk")
5. Tilsæt 1 ml naphthol-AS-D-chloroacetatopløsning. Opløsningen skal blive rød. Bland opløsningen godt, og hæld den i en Coplin-skål.
6. Bring citrat-acetone-formaldehydopløsningen (CAF) op på stuetemperatur (18-26 °C). Fikser objektglassene ved at nedsænke dem i CAF-opløsningen i 30 sekunder.
7. Skyl objektglassene grundigt i rindende demineraliseret vand i 45-60 sekunder, og anbring dem derefter i opløsning fra trin 5. Lad ikke objektglassene tørre.
8. Inkuber i 15 minutter ved 37 °C beskyttet mod lys.
9. Efter 15 minutter fjernes objektglassene og skylles grundigt i demineraliseret vand i mindst 2 minutter.
10. Kontrastfarv i 2 minutter i hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3.
11. Skyl i postevand, og lad dem lufttørre.
12. Evaluer mikroskopisk. Brug udelukkende vandige monteringsmedier, hvis dækglasser er påkrævet.

Bemærkninger

- Når der anvendes Columbia-skåle, skal reagensvolumenen divideres med 5.
- Hvis substratet (se trin 5) virker grumset, skal det bringes til stuetemperatur (18-26 °C) og blandes godt.
- Hvis objektglassene er blevet præfikseret og opbevaret, skal fikseringen springes over (trin 6 og 7) og farvningen af tørre, præfikserede objektglas begyndes ved trin 8.

α-naphthylacetatesterase-procedure

- Forvarm tilstrækkeligt demineraliseret vand til substratbrug til 37 °C. Kontrollér temperaturen inden brug.
- Umiddelbart inden fiksering tilsættes 1 ml natriumnitritopløsning til 1 ml Fast Blue BB-baseopløsning i et reagensglas. Bland opløsningen ved at vende den op og ned, og lad den stå i mindst 2 minutter. Farven vil skifte fra snavset brun til dyb gul. Aktiv udvikling af gasbobler skal undgås.
- Tilsæt opløsningen fra trin 2 til 40 ml forvarmet, demineraliseret vand fra trin 1.
- Tilsæt 5 ml TRIZMAL™ 7.6-bufferkoncentrat.
- Tilsæt 1 ml α-naphthylacetat-opløsning. Opløsningen skal blive grønlig. Bland opløsningen godt, og hæld den i en Coplin-skål.
- Bring citrat-acetone-formaldehydopløsningen (CAF) op på stuetemperatur (18-26 °C). Fikser objektglassene ved at nedsænke dem i CAF-opløsningen i 30 sekunder. Ryst objektglassene kraftigt i de sidste 5 sekunder.
- Skyl objektglassene grundigt i rindende demineraliseret vand i 45-60 sekunder, og anbring dem derefter i opløsning fra trin 5. Lad ikke objektglassene tørre.
- Inkuber i 30 minutter ved 37 °C beskyttet mod lys.
- Efter 30 minutter fjernes objektglassene og skylles grundigt i rindende demineraliseret vand i mindst 2 minutter.
- Kontrastfarv i 2 minutter i hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3.
- Skyl i postevand, og lad dem lufttørre.
- Evaluer mikroskopisk. Brug udelukkende vandige monteringsmedier, hvis dækglas er påkrævet.

Bemærkninger

- Når der anvendes Columbia-skåle, skal reagensvolumenen divideres med 5.
- Hvis substratet (se trin 5) virker grumset, skal det bringes til stuetemperatur (18-26 °C) og blandes godt.
- Hvis objektglassene er blevet præfikseret og opbevaret, skal fikseringen springes over (trin 6 og 7) og farvningen af tørre, præfikserede objektglas begyndes ved trin 8.

Dobbeltfarvende esterase-procedure

- Udfør α-naphthylacetatesterase-testen som beskrevet i proceduren. Undlad at kontrastfarve.
- Skyl objektglassene i 5 minutter i demineraliseret vand.
- Udfør naphthol-AS-D-chloracetatesterase-testen som beskrevet i procedurens trin 1-12. Udelad trin 6.

Bemærk

Fast Blue BB-baseopløsning kan erstattes med Fast Red Violet LB-baseopløsning, hvis blå granulering foretrækkes til naphthol-AS-D-chloracetatesterase.

α-naphthylacetatesterase med fluoridinhibering-procedure

Selvom α-naphthylacetatesterase findes primært i celler af monocytisk afstamning, når testen udføres som beskrevet, bør det erkendes, at megakaryocytter og erythroide prækursorer er positive for dette enzym.¹¹ Lymfocytter og visse modne granulocytter udviser også lejlighedsvis positivitet.⁴ For at differentiere disse celler endegyldigt fra monocytter, inkorporeres natriumfluorid i inkubationssystemet. Monocytenzymet inaktiveres ved tilstedeværelse af denne forbindelse.¹² Følgende procedure kan bruges til at udføre fluoridinhiberingstesten.

- Tilsæt 2 ml natriumnitritopløsning til 2 ml Fast Blue BB-baseopløsning. Bland ved forsigtig inversion. Lad opløsningen stå i 2 minutter.
- Mærk 2 bægerglas A og B, og tilsæt følgende:

	Bægerglas A	Bægerglas B
Demineraliseret vand, der er forvarmet til 37 °C	40 ml	40 ml
Diazotiseret Fast Blue BB fra trin 1	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7.6-koncentrat	5 ml	5 ml
α-naphthylacetat-opløsning	1 ml	1 ml
Natriumfluoridopløsning	-	1 ml

- Bland godt, og hæld i Coplin-skåle, der er mærket A og B.
- Gå frem som beskrevet i trin 6-12 i α-naphthylacetatesterase-proceduren.

Præstationskarakteristika

Scoringsmetode

Scan filmen, og vælg et tyndt område med få erythrocytter. Steder med naphthol-AS-D-chloracetatesterase-aktivitet vil fremstå som klart rød granulering, og α-naphthylacetatesterase som sort granulering. Klassificer fra 0 til 4+ på basis af mængden og intensiteten af individuelle farvestoffer i cytoplasmaet i de respektive celletyper. Karakteristika for scoring er i nogen grad baseret på subjektiv fortolkning. Et foreslået scoringsformat er vist i tabel 1. Konklusioner fokuserer på relativ tilstedeværelse eller fravær af farvning.

Tabel 1. Karakteristika for scoring

Celleklassificering	Farvningsintensitet	Fortolkning
0+	Ingen	–
1+	Svag til moderat	±
2+	Moderat til kraftig	+
3+	Kraftig	+
4+	Strålende	+

Forventede observationer

Naphthol-AS-D-chloracetatesterase

(Fast Red Violet LB) - dette enzym anses normalt for at være specifikt for celler af granulocytisk afstamning. Aktivitetssteder udviser klar rød granulering. Aktiviteten er svag eller fraværende i monocytter og lymfocytter.

α-naphthylacetatesterase

(Fast Blue BB) - dette enzym detekteres primært i monocytter, makrofager og histiocytter og er praktisk talt fraværende i granulocytter. Monocytter bør udvise sort granulering. Lymfocytter kan lejlighedsvist udvise enzymaktivitet.

Dobbeltfarvende esterase

Prøver, som gennemgår dobbeltfarvningsproceduren, vil udvise granulocytter med rød granulering og monocytter med sort granulering.

α-naphthylacetatesterase med fluoridinhibering

Alle celler af monocytisk afstamning vil være negative for enzymaktivitet, med undtagelse af differentierede histiocytter eller specialiserede makrofager i væv, som også kan være resistente over for natriumfluorid.¹⁰

Kvalitetskontrol

Reagenssystemet skal overvåges ved brug af positive og negative kontrolobjektglas.

Positive kontrolobjektglas kan fremstilles ud fra specifikke cellelinjer, der vides at være positive.

Alternativt kan der også anvendes anti-koaguleret blod fra normale prøver (fortrinsvis med øget monocytal, hvis α-naphthylacetatesterase-proceduren benyttes). De vil dog give mindre intens farvning og vil have færre positive celler.

Kendte negative patientobjektglas kan bruges som en negativ kontrol. Hvis disse ikke er tilgængelige, vil farvning af en prøve i en inkubationsblanding med substratet udeladt give de ønskede resultater. Brug af førstnævnte anbefales dog kraftigt.

Kontakt Sigma-Aldrichs tekniske service for at få assistance, hvis de observerede resultater afviger fra de forventede resultater.

Analytiske præstationskarakteristika

Resultaterne for analyseydelsen for de givne tests, som blev udført på alle målstrukturer, bekræfter 100 % sensitivitet, specificitet og repeatabelhed.

Kat. nr.	Produktbeskrivelse	Mål	Specificitet inden for analyse	Sensitivitet inden for analyse	Specificitet mellem analyser	Sensitivitet mellem analyser
911	Naphthol-AS-D-chloracetatopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
912	Fast Red Violet LB-baseopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
913	TRIZMAL™ 6.3-koncentrat	Osmolalitet	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
		pH	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
914	Nitratopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
915	Citratopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
916	α-naphthylacetat-opløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
917	Fast Blue BB-baseopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
918	TRIZMAL™ 7.6-koncentrat	Osmolalitet	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
		pH	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
919	Natriumfluorid-opløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
		GHS3	Hæmatoxylin-opløsning, Gill nr. 3	Kerner	3 af 3	3 af 3

Advarsler og farer

Se sikkerhedsdatabladet og produktmærkningen vedrørende opdaterede risiko-, fare- eller sikkerhedsoplysninger.

91A:



H226 Brandfarlig væske og damp.

H290 Kan ætse metaller.

H301 Giftig ved indtagelse.

H312 + H332 Farlig ved hudkontakt eller ved indånding.

H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.

H370 Forårsager organskader (øjne, centralnervesystem).

H412 Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.

P210 Holdes væk fra varme, varme overflader, gnister, åben ild og andre antændelseskilder. Rygning forbudt.

P273 Undgå udledning til miljøet.

P280 Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

P301 + P310 I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Ring omgående til en GIFTINFORMATION/læge.

P303 + P361 + P353 VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Alt tilsmudset tøj tages straks af. Skyl huden med vand.

P304 + P340 + P312 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes. Kontakt GIFTLINJEN/en læge i tilfælde af ubehag.

91C:



- H290 Kan ætse metaller.
- H302 Farlig ved indtagelse.
- H315 Forårsager hudirritation.
- H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion.
- H318 Forårsager alvorlig øjenskab.
- H335 Kan forårsage irritation af luftvejene.
- H360FD Kan skade forplantningsevnen. Kan skade det ufødte barn.
- H373 Kan forårsage organskader (nyrer) ved længerevarende eller gentagen eksponering ved indtagelse.
- P202 Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået.
- P280 Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
- P301 + P312 I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Kontakt GIFTLINJEN/en læge i tilfælde af ubehag.
- P302 + P352 VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand.
- P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
- P308 + P313 VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.

Hvis der er opstået en alvorlig hændelse under brugen af dette produkt eller som følge af dets brug, skal det indberettes til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og til den nationale myndighed i brugerens land.

Symboldefinitioner

Symboler som defineret i EN ISO 15223-1:2021

	Producent		Katalognummer
	Se brugsanvisningen		Batchkode
	Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/ Den Europæiske Union		Den Europæiske Unions overensstemmelseserklæring (defineret i IVDR 2017/746)
	Sidste anvendelsesdato		Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Temperaturgrænse		Forsigtig
	Fremstillingsdato		Importør
	Angiver autoriseret repræsentant i Schweiz		

Referencer

1. Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Kontaktoplysninger

Besøg vores websted på SigmaAldrich.com for at afgive en bestilling. Gå til siden for teknisk service på vores websted på SigmaAldrich.com/techservice for at få oplysninger om teknisk service.

Revisionshistorik

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Overført til ny skabelon med nuværende branding. Specificeret til professionel brug under tilsigtet brug og forsigtighedsregler. Revideret tilsigtet brug for at tilpasse til IVDR-retningslinjer. Opdateret materialsikkerhedsdatablad til sikkerhedsdatablad. Opdateret kontaktoplysninger. Fjernet instruks om at følge CLSI vedrørende prøveindsamling. Fjernet EN 980 og ændret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. Tilføjet kontaktoplysninger i tilfælde af uønskede hændelser. Opdateret litteraturhenvisninger. Tilføjet en revisionshistoriktabel. Tilføjet advarsler og farer. Tilføjet information om repræsentant i Schweiz.

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Bruksanvisning

Leukocyt α-naftylacetat (icke-specifikt esteras) och leukocytnaftol AS-D kloracetat-sats (specifikt esteras)

Förfarande nr. 91



Avsedd användning

Sigma-Aldrich Naphthol AS-D kloracetatesteras och α-Naphthyl acetatesteras-satser är avsedda som histologisk färgning för allmän laboratorieanvändning. Naftol AS-D kloracetatesteras och α-naftylacetatesteras-reagenser är endast för professionell "in vitro-diagnostisk användning". Det här manuella, kvalitativa och histokemiska förfarandet påvisar Naftol AS-D kloracetatesteras och α-naftylacetatesteras-aktivitet i leukocyter i mänskligt blod, benmärgsfilmer eller beröringspreparat för vävnader. Histologisk visualisering av leukocytcellerära esteraser är en unik teknik som för närvarande ofta används inom medicinska områden.

Cellulära esteraser finns överallt och verkar representera en serie olika enzymer som agerar på vissa substrat. Under definierade reaktionsomständigheter kan det vara möjligt att bestämma hemopoietiska celltyper med hjälp av specifika esterassubstrat. De beskrivna metoderna ger hematologer och hematopatologer medel för att särskilja granulocyter från monocyter.¹⁻⁷

För att utföra testet inkuberas blod, benmärgsfilmer och beröringspreparat för vävnader med antingen naftol-AS-D-kloracetat (NCAE) eller α-naftylacetat (NAE) i närvaron av nyligen format diazoniumsalt. Enzymatisk hydrolys av esterbindningar frigör fria naftolföreningar. Dessa binder med diazoniumsalt och bildar starkt färgade färgavlagringar på ställen med enzymaktivitet.

De flesta nyare förfaranden, inklusive de som tillhandahålls av Sigma-Aldrich, använder stabila diazoniumsalter. Dessa bildas genom att reagera en ariylamin med natriumnitrit i ett surt medium.⁸ Den resulterande diazoniumkloriden (vanligtvis instabil) kan sedan behandlas med föreningar som zinkklorid, zinksulfat eller naftalen-1-6-disulfonat, vilket bildar stabila salter. Dessa stabiliseringsmedel kan utöva markant hämning på vissa enzymsystem, medan diazoniumkloriderna är mindre hämmande.⁸ Av denna anledning tillhandahåller Sigma-Aldrich nu stabila lösningar av Fast Red Violet LB-bas, Fast Blue BB-bas och natriumnitrit för esterascytokemi. För att ytterligare förenkla dessa metoder inkluderas stabila lösningar av naftol-AS-D-kloracetat och α-naftylacetat. Tillgängligheten av dessa stabila lösningar tillåter kunderna att justera arbetsreagensvolymerna efter behov, vilket eliminerar slöseri.

Reagenser

Naftol-AS-D-kloracetatlösning (kat.-nr 911-10ML).

Naftol-AS-D-kloracetat, 8 mg/ml, och stabiliseringsmedel. Varning. Orsakar ögonirritation. OM LÖSNINGEN KOMMER I ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

Fast Red Violet LB-baslösning (kat.-nr. 912-10ML)

Fast Red Violet LB-bas, 15 mg/ml, i 0,4 mol/l saltsyra med stabiliseringsmedel. Fara. Orsakar allvarliga brännskador på huden samt ögonskador. Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

TRIZMA™ 6.3-koncentrat (kat.-nr. 913-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/l, med ytaktivt ämne. pH 6,3 ± 0,15 vid 25 °C. Fara. Orsakar hudirritation. Kan orsaka allergisk hudreaktion. Orsakar allvarliga ögonskador. Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

Natriumnitritlösning (kat.-nr. 914-10ML)

Nitrit, 0,1 mol/l

Citratlösning (kat.-nr. 915-50ML)

Citronsyra, 18 mmol/l, natriumcitrat, 9 mmol/l, natriumklorid, 12 mmol/l med ytaktivt ämne, pH 3,6 ± 0,1 vid 25 °C

α-naftylacetatlösning (kat.-nr. 916-10ML)

α-naftylacetat, 12,5 mg/ml, i metanolösning med stabiliseringsmedel. Fara. Brandfarlig vätska och ånga. Giftigt vid förtäring. Farligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar lindrig hudirritation. Orsakar allvarlig ögonirritation. Orsakar skador på organ.

Fast Blue BB-baslösning (kat.-nr. 917-10ML)

Fast Blue BB-bas, 15 mg/ml, C.I. 37175 i 0,4 mol/l saltsyra med stabiliseringsmedel. Varning. Skadligt vid förtäring. Orsakar lindrig hudirritation. Orsakar allvarlig ögonirritation. OM LÖSNINGEN KOMMER IN I ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt.

TRIZMA™ 7.6-koncentrat (kat.-nr 918-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/l, med ytaktivt ämne. pH 7,6 ± 0,15 vid 25 °C. Fara. Orsakar hudirritation. Orsakar allvarliga ögonskador. Kan orsaka allergiska eller astmatiska symptom och andningssvårigheter vid inandning. Kan orsaka irritation i luftvägarna. Skadligt för vattenlevande organismer.

Hematoxylinlösning Gill nr. 3 (kat.-nr. GHS3-50ML)

Certifierad hematoxylin, 6,0 g/l, C.I. 75290, natriumjodat, 0,6 g/l, och aluminiumsulfat, 52,8 g/l med stabiliseringsmedel. Fara. Skadligt vid förtäring. Orsakar allvarliga ögonskador. Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

Natriumfluoridlösning (kat.-nr. 919-25ML)

Natriumfluorid, 20 g/l. Varning. Skadligt vid förtäring. Orsakar lindrig hudirritation.

Särskilt materiel som krävs men inte tillhandahålls

- Aceton, ACS-reagens
- Formaldehyd, 37 % ACS
- Natriumfluoridlösning, kat.-nr. 919-25ML (Krävs för förfarande för α-naftylacetatesteras med fluoridhämning)

Förvaring och hållbarhet

Förvara hematoxylinlösningen Gill nr. 3 i rumstemperatur (18–26 °C) skyddad från ljus. Förvara andra reagenser i kylskåp (2–8 °C).

TRIZMA™ 6.3-koncentrat, TRIZMA™ 7.6-koncentrat och citratlösning är lämpliga för användning vid frånvaro av mikrobiell tillväxt. Andra reagenser är hållbara fram till utgångsdatumet som anges på märkningen.

Försämring

Kassera TRIZMA™-koncentrat och citratlösning om mikrobiell tillväxt uppstår. Kassera hematoxylinlösning Gill nr. 3 om den blir brun (överoxiderad av luft) eller lila (minskad surhet).

Beredning

Värm reagenserna till rumstemperatur (18–26 °C) innan de ska användas. Esterasreagenser tillhandahålls redo att användas.

Citratacetonaldehydfixeringsmedel: Tillsätt 65 ml aceton och 8 ml 37 % formaldehyd till 25 ml citratlösning. Håll i glasflaska och tillslut tätt. Förvaras i kylskåp (2–8 °C). Låt den uppnå rumstemperatur (18–26 °C) före användning. Stabil i upp till fyra veckor om den förvaras med tätt lock i kylskåp.

Försiktighetsåtgärder

De medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik som ingår i dessa kit är avsedda att användas i klinisk laboratoriemiljö. Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är endast avsedda att användas av kvalificerad personal. Medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik från Sigma-Aldrich får användas av laboratoriepersonal som är utbildad i hantering av humanprover som kan vara smittsamma, användning av mikroskop och annan laboratorietrustning samt har tillräckligt bär förgäende och synskärpa för att kunna urskilja färger och andra föremål under mikroskop.

Följ sedvanliga försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser. Kassera avfall i enlighet med alla lokala, statliga, regionala och nationella bestämmelser.

Förfarande

Provtagning

Inga kända testmetoder kan erbjuda fullständig garanti för att inte smitta överförs genom blodprover eller vävnad. Därför måste alla blodderivat och vävnadsprover betraktas som potentiellt smittsamma.

Blod, benmärgsfilmer, beröringspreparat för vävnader och cytocentrifugpreparat kan användas med både α-naftylacetatesteras och naftol-AS-D-kloracetatesteras. Antingen EDTA eller heparin kan användas som antikoagulant.⁹ Frysta och paraffinbäddade vävnader kan användas med naftol-AS-D-kloracetatesteras. α-naftylacetatesteras kan användas framgångsrikt på frysta vävnadsprover.¹⁰ Blod- eller benmärgsfilmer kan förvaras fixerade i rumstemperatur (18–26 °C) i flera veckor och icke-fixerade i flera dagar utan märkbar förändring i aktivitet.^{4,9} Frakta inte helblod för analys på andra laboratorier. Skicka fixerade eller ofixerade objektglas. Objektglaset ska förvaras svaltt under transporten. Låt filmerna torka minst 1 timme före fixering.

Förfarandets begränsningar

De beskrivna förfarandena utförs vid 37 °C. Om reagenser inte är vid denna temperatur kan svaga eller negativa reaktioner erhållas. Det rekommenderas att temperaturen kontrolleras med en precis termometer. Vattenbad med kontrollerad temperatur är mer effektiva än varmluftsinkubatorer och bör användas för enzymcytokemiska metoder. Värmeöverföring genom glas är snabbare än genom plast och därför bör Coplin-burkar användas.

Många enzymsystem är känsliga för ytterst små spår av rengöringsmedel. Att tvätta glasvaror med utspätt blekmedel och sedan skölja med rikliga mängder avjoniserat vatten kommer förhindra rengöringsmedelseffekter på cellulära enzymer.

Fixeringsmedelssystemet som beskrivs i avsnittet "Reagenser" innehåller formaldehyd. Om fixeringsmedel inte helt avlägsnas genom kraftig sköljning kan vilken mängd aldehyd som helst, antingen koncentrerat på lufttorkade objektglas eller spårämnen från våta objektglas, som läggs till i inkubationssystemet resultera i enzymhämning. För att förhindra förlust av blodfilm under sköljningsprocessen ska du rikta vattenströmmen på objektglaset ovan fjäderkanten. Skölj båda sidorna av objektglaset.

Resultaten baseras på en viss grad av subjektiv bedömning. Individuella laboratorier bör etablera sina egna normalintervaller.

Anmärkningar

Användare av Sigmas satser 390A och 91C bör vara försiktiga när de använder TRIZMA® buffertkoncentrat med katalognummer 913 och 903C eftersom de inte är utbytbara. Användning av fel buffert kommer orsaka en negativ reaktion.

Förfarande

De beskrivna förfarandena utförs vid 37 °C.

Förfarande för naftol-AS-D-kloracetatesteras

1. Förvärm tillräckligt med avjoniserat vatten för substratsanvändning till 37 °C. Kontrollera temperaturen före användning.
2. Omedelbart före fixering ska du tillsätta 1 ml natriumnitritlösning till 1 ml Fast Red Violet LB-baslösning i ett provrör. Blanda försiktigt genom att vända och låt stå i 2 minuter. Aktiv utveckling av gasbubblor bör undvikas.
3. Tillsätt lösning från steg 2 till 40 ml förvämt avjoniserat vatten från steg 1.
4. Lägg till 5 ml TRIZMA™ 6.3 buffertkoncentrat. (Se "Observanda")
5. Lägg till 1 ml naftol-AS-D-kloracetatlösning. Lösningen bör bli röd. Blanda väl och håll i Coplin-burk.
6. Få upp citratacetonaldehydlösningen (CAF) till rumstemperatur (18–26 °C). Fixera objektglaset genom att doppa i CAF-lösning i 30 sekunder.
7. Skölj objektglaset ordentligt i rinnande avjoniserat vatten i 45–60 sekunder, placera sedan i lösningen från steg 5. Låt inte objektglaset torka.
8. Inkubera i 15 minuter, vid 37 °C skyddad från ljus.
9. Efter 15 minuter ska du ta ut objektglaset och skölja ordentligt i avjoniserat vatten i minst 2 minuter.
10. Motfärga i 2 minuter i hematoxylinlösning, Gill nr. 3.
11. Skölj i kranvatten och lufttorka.
12. Utvärdera mikroskopiskt. Om täckglas behövs ska endast ett vattenbaserat monteringsmedium användas.

Anmärkningar

- För användning med Columbia-burkar ska du dela reagensvolymen med 5.
- Om substrat (se steg 5) verkar grumligt ska du värma till rumstemperatur (18–26 °C) och blanda väl.
- Om objektglas har förfixerats och förvarats ska du hoppa över fixeringen (steg 6 och 7) och börja färgningen av torra, förfixerade objektglas i steg 8.

Förfarande för α-naftylacetatesteras

- Förvärm tillräckligt med avjoniserat vatten för substratsanvändning till 37 °C. Kontrollera temperaturen före användning.
- Omedelbart före fixering ska du tillsätta 1 ml natriumnitritlösning till 1 ml Fast Blue BB-baslösning i ett provrör. Blanda genom att vända och låt stå i minst 2 minuter. Färgen kommer ändras från smutsbrun till djupt gul. Aktiv utveckling av gasbubblor bör undvikas.
- Tillsätt lösning från steg 2 till 40 ml förvämt avjoniserat vatten från steg 1.
- Lägg till 5 ml TRIZMAL™ 7.6 buffertkoncentrat.
- Lägg till 1 ml α-naftylacetatlösning. Lösningen bör bli grönaktig. Blanda väl och håll i Coplin-burk.
- Få upp citratacetonformaldehydlösningen (CAF) till rumstemperatur (18–26 °C). Fixera objektglasen genom att doppa i CAF-lösning i 30 sekunder. Blanda kraftigt i minst 5 sekunder.
- Skölj objektglasen ordentligt i rinnande avjoniserat vatten i 45–60 sekunder, placera sedan i lösningen från steg 5. Låt inte objektglasen torka.
- Inkubera i 30 minuter, vid 37 °C skyddad från ljus.
- Efter 30 minuter ska du ta ut objektglasen och skölja ordentligt i rinnande avjoniserat vatten i minst 2 minuter.
- Motfärga i 2 minuter i hematoxylinlösning, Gill nr. 3.
- Skölj i kranvatten och lufttorka.
- Utvärdera mikroskopiskt. Om täckglas behövs ska endast ett vattenbaserat monteringsmedium användas.

Anmärkningar

- För användning med Columbia-burkar ska du dela reagensvolymen med 5.
- Om substrat (se steg 5) verkar grumligt ska du värma till rumstemperatur (18–26 °C) och blanda väl.
- Om objektglas har förfixerats och förvarats ska du hoppa över fixeringen (steg 6 och 7) och börja färgningen av torra, förfixerade objektglas i steg 8.

Förfarande med dubbelfärgningsesteras

- Utför α-naftylacetatesterastest som beskrivits i förfarandet. Motfärga inte.
- Skölj objektglas i 5 minuter i avjoniserat vatten.
- Utför naftol-AS-D-kloracetatesterastest enligt beskrivningen i förfarandets steg 1–12. Uteslut steg 6.

Obs!

Fast Red Violet LB-baslösning kan bytas ut mot Fast Blue BB-baslösning om blå granulering föredras för naftol-AS-D-kloracetatesteras.

Förfarande för α-naftylacetatesteras med fluoridhämmning

Trots att α-naftylacetatesteras framförallt hittas i monocytiska celler när det utförs som beskrivet bör det bekräftas att megakaryocyter och erytroida förstadier är positiva för den här enzymen.¹¹ Lymfocyter och vissa mogna granulocyter ser också ibland positiva ut.⁴ För att särskilja dessa celler från monocyter med säkerhet inkorporeras natriumfluorid i inkubationssystemet. Monocytenzymet är avaktiverat i närvaro av denna förening.¹² Följande förfarande kan användas för att utföra fluoridhämmningstestet.

- Lägg till 2 ml natriumnitritlösning till 2 ml Fast Blue BB-baslösning. Blanda genom att vända försiktigt. Låt stå i 2 minuter.
 - Märk 2 bägare A och B och tillsätt följande:
- | | Bägare A | Bägare B |
|---------------------------------------|----------|----------|
| Avjoniserat vatten förvämt till 37 °C | 40 ml | 40 ml |
| Diazotiserad Fast Blue BB från steg 1 | 2 ml | 2 ml |
| TRIZMAL™ 7.6-koncentrat | 5 ml | 5 ml |
| α-naftylacetatlösning | 1 ml | 1 ml |
| Natriumfluoridlösning | - | 1 ml |
- Blanda väl och håll i Coplin-burkar märkta A och B.
 - Fortsätt som beskrivits i steg 6–12 i förfarandet för α-naftylacetatesteras.

Prestandaegenskaper

Värderingsmetod

Granska filmen och välj ett smalt område med få erythrocyter. Ställen med aktivitet av naftol-AS-D-kloracetatesteras kommer uppträda som klarröd granulering, α-naftylacetatesteras som svart granulering. Bedöm från 0 till 4+ baserat på kvantitet och intensitet av individuella färgämnen inom de respektive celltypernas cytoplasma. Egenskaper för värdebestämmande är baserade på något subjektiva tolkningar. Ett företaget värdebestämmandeformat presenteras i tabell 1. Slutsatser baseras på den relativa närvaron eller frånvaron av färgning.

Tabell 1. Egenskaper för värdebestämmande

Cellbedömning	Färgningsintensitet	Tolkning
0+	Ingen	–
1+	Svag till medel	±
2+	Medel till stark	+
3+	Stark	+
4+	Mycket stark	+

Förväntade observationer

Naftol-AS-D-kloracetatesteras

(Fast Red Violet LB) – Enzym anses vanligtvis specifikt för granulocyta celler. Aktivitetsställen visar starkt röd granulering. Aktiviteten är svag eller frånvarande i monocyter och lymfocyter.

α-naftylacetatesteras

(Fast Blue BB) – Enzym detekteras främst i monocyter, makrofager och histiocyter och är praktiskt taget frånvarande i granulocyter. Monocyter bör uppvisa svart granulering. Lymfocyter kan stundtals visa enzymaktivitet.

Dubbelfärgningsesteras

Prover som tagits genom dubbelfärgningsförfarande kommer uppvisa granulocyter med röd granulering och monocyter med svart granulering.

α-naftylacetatesteras med fluoridhämmning

Alla monocytiska celler kommer vara negativa för enzymaktivitet med undantag för differentierade histiocyter eller specialiserade makrofager i vävnad vilka även kan vara resistent mot natriumfluorid.¹⁰

Kvalitetskontroll

Reagenssystemet bör kontrolleras med hjälp av positiva och negativa kontrollobjektglas.

Positiva kontrollobjektglas kan framställas från specifika cellinjer som är kända som positiva.

Alternativt kan anti-koagulerat blod från normala prover (helst med ökande monocytantal om α-naftylacetatesterasförfarande används) också användas. Det ger dock mindre intensiv färgning och kommer ge färre positiva celler.

Kända negativa patientobjektglas kan användas som en negativ kontroll. Om de inte finns tillgängliga kan önskad effekt uppnås genom att färga ett prov i en inkubationsblandning utan substratet. Men att använda det första alternativet rekommenderas starkt.

Kontakta teknisk service på Sigma-Aldrich för hjälp ifall resultaten som observeras avviker från de förväntade resultaten.

Analytiska prestandaegenskaper

De analytiska prestandaresultaten för de givna testerna utförda på alla målstrukturer bekräftar 100 % sensitivitet, specificitet och repeterbarhet.

Kat.-nr.	Produktbeskrivning	Mål	Specificitet inom analys	Sensitivitet inom analys	Specificitet mellan analyser	Sensitivitet mellan analyser
911	Naftol-AS-D-kloracetatlösning.	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
912	Fast Red Violet LB-baslösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
913	TRIZMAL™ 6.3 koncentrat	Osmolalitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
		pH	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
914	Natriumnitrat-lösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
915	Citratlösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
916	α-naftylacetatlösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
917	Fast Blue BB-baslösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
918	TRIZMAL™ 7.6-koncentrat	Osmolalitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
		pH	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
919	Natriumfluorid-lösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
GHS3	Hematoxylinlösning, Gill nr. 3	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Varningar och faror

Se säkerhetsdatabladet och produktmärkningen för uppdaterad information om risker, fara och säkerhet.

91A:



H226 Brandfarlig vätska och ånga.

H290 Kan vara frätande på metaller.

H301 Giftigt vid förtäring.

H312 + H332 Farligt vid hudkontakt eller inandning.

H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.

H370 Orsakar skador på organ (ögon, centrala nervsystemet).

H412 Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.

P210 Håll borta från värme, heta ytor, gnistor, öppna lågor och andra antändningskällor. Rökning förbjuden.

P273 Undvik utsläpp i miljön.

P280 Använd skyddshandskar/skyddskläder/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

P301 + P310 VID FÖRTÄRING: Ring omedelbart till en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P303 + P361 + P353 VID HUDKONTAKT (eller hår): Ta omedelbart av alla kontaminerade kläder. Skölj huden med vatten.

P304 + P340 + P312 VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att personen andas utan problem. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare om du mår dåligt.

91C:



- H290 Kan vara frätande på metaller.
- H302 Skadligt vid förtäring.
- H315 Orsakar hudirritation.
- H317 Kan orsaka en allergisk hudreaktion.
- H318 Orsakar allvarliga ögonskador.
- H335 Kan orsaka irritation i luftvägarna.
- H360FD Kan skada fertiliteten. Kan skada det ofödda barnet.
- H373 Kan orsaka skador på organ (njurar) genom långvarig eller upprepad exponering vid förtäring.
- P202 Hantera inte förrän alla säkerhetsföreskrifter har lästs och förstås.
- P280 Använd skyddshandskar/skyddskläder/skyddsglasögon/ansiktsskydd.
- P301 + P312 VID FÖRTÄRING: Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare om du mår dåligt.
- P302 + P352 VID KONTAKT MED HUDEN: Tvätta med mycket vatten.
- P305 + P351 + P338 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
- P308 + P313 Vid exponering eller misstanke om exponering: Uppsök läkare.

Om det har inträffat ett allvarligt tillbud medan denna enhet använts eller som ett resultat av att den har använts ska det rapporteras till tillverkaren och/eller dess auktoriserade representant samt myndigheten i ditt land.

Symbolförklaring

Symboler enligt definition i EN ISO 15223-1:2021

	Tillverkare		Katalognummer
	Se bruksanvisningen		Batchkod
	Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen/ Europeiska unionen		EU-försäkran om överensstämmelse (definieras i IVDR 2017/746)
	Utgångsdatum		Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	Temperaturgräns		Försiktighet
	Tillverkningsdatum		Importör
	Anger den auktoriserade representanten i Schweiz		

Referenser

- Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
- Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
- Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, sid. 88–113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas och Febriger, Philadelphia, 1984, sid. 127–130
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, sid. 24, 38
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, sid. 34, 111
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Kontaktuppgifter

För att göra en beställning besöker du vår webbplats på [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). För teknisk service besöker du sidan för teknisk service på vår webbplats [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorik

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Överfört till ny mall med nuvarande varumärke. Specifierat "För yrkesmässigt bruk" under "Avsedd användning" och under "Försiktighetsåtgärder". Reviderat "Avsedd användning" så att det motsvarar riktlinjerna för IVDR. Uppdaterat "Materialsäkerhetsdatablad" till "Säkerhetsdatablad". Uppdaterat kontaktuppgifterna. Tagit bort anvisningen om att CLSI ska följas vid provtagning. Tagit bort EN 980 och ändrat till EN ISO 15223-1:2021 för symbolerna. Lagt till kontaktuppgifter för negativa händelser. Uppdaterat litteraturreferenserna. Lagt till en tabell över revisionshistoriken. Lagt till varningar och faror. Lagt till information om representant i Schweiz.

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M och Sigma-Aldrich är varumärken som tillhör Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dess dotterbolag. Övriga varumärken tillhör respektive ägare. Detaljerad information om varumärken finns tillgänglig via allmänt tillgängliga resurser.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Instruções de utilização

Kit de acetato de α -naftilo de leucócitos (esterase não específica) e de cloroacetato de naftol AS-D de leucócitos (esterase específica)

Procedimento N.º 91

MILLIPORE
SIGMA

IVD

CE

Utilização prevista

Os Kits de esterase de acetato de α -naftilo e de esterase de cloroacetato de naftol AS-D da Sigma-Aldrich destinam-se a ser utilizados como corantes histológicos para uso geral em laboratório. Os reagentes de esterase de acetato de α -naftilo e de esterase de cloroacetato de naftol AS-D destinam-se somente a "Utilização para diagnóstico in vitro" por profissionais. Este procedimento histoquímico, qualitativo e manual, destina-se a demonstrar atividade de esterase de acetato de α -naftilo e de esterase de cloroacetato de naftol AS-D em leucócitos de sangue humano, películas de medula óssea ou preparações por contacto de tecido. A visualização histológica das esterases celulares de leucócitos é uma técnica única atualmente utilizada em medicina.

As esterases celulares são ubíquas, representando aparentemente uma série de diferentes enzimas que atuam sobre substratos selecionados. Em condições de reação definidas, pode ser possível determinar tipos de células hemopoéticas, utilizando substratos específicos de esterase. Os métodos descritos fornecem aos hematologistas e hematopatologistas os meios para distinguir granulócitos de monócitos.¹⁻⁷

Para realizar o teste, sangue, películas de medula óssea ou preparações por contacto de tecido são incubados com cloroacetato de naftol AS-D (NCAE) ou acetato de α -naftilo (NAE) na presença de um sal de diazónio recém-formado. A hidrólise enzimática de ligações de ésteres liberta compostos de naftol livres. Estes acoplam-se com o sal de diazónio, formando depósitos altamente coloridos nos locais de atividade enzimática.

A maioria dos procedimentos recentes, incluindo os fornecidos pela Sigma-Aldrich, emprega sais de diazónio estáveis. Estes são formados pela reação de uma arilamina com nitrito de sódio num meio ácido.⁸ O cloreto de diazónio resultante (geralmente instável) pode ser então tratado com compostos, tais como cloreto de zinco, sulfato de zinco ou naftaleno-1,6-dissulfonato, formando sais estáveis. Estes estabilizadores podem exercer uma inibição acentuada em alguns sistemas enzimáticos, ao passo que os cloretos de diazónio são menos inibitórios.⁹ Por este motivo, a Sigma-Aldrich fornece agora soluções estáveis de Base vermelha violeta rápida LB, Base azul rápida BB e Nitrito de sódio para citotóxica de esterase. Para simplificar estes métodos ainda mais, estão incluídas soluções estáveis de Cloroacetato de naftol AS-D e Acetato de α -naftilo. A disponibilidade destas soluções estáveis permite ao cliente ajustar os volumes de reagentes de trabalho de acordo com as necessidades, eliminando desperdícios.

Reagentes

Solução de Cloroacetato de naftol AS-D (N.º de cat. 911-10ML)

Cloroacetato de naftol AS-D, 8 mg/ml, e estabilizante. Aviso. Provoca irritação ocular. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Solução de Base vermelha violeta rápida LB (N.º de cat. 912-10ML)

Base vermelha violeta rápida LB, 15 mg/ml, em 0,4 mol/l de ácido clorídrico com estabilizadores. Perigo. Provoca queimaduras cutâneas graves e lesões oculares. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Concentrado TRIZMAL™ 6,3 (N.º de cat. 913-50ML)

Maleato TRIZMA®, 1 mol/l, com tensoativo. pH 6,3 $\pm$ 0,15 a 25 °C. Perigo. Provoca irritação cutânea. Pode provocar reação alérgica cutânea. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Solução de Nitrito de sódio (N.º de cat. 914-10ML)

Nitrito de sódio, 0,1 mol/l

Solução de Citrato (N.º de cat. 915-50ML)

Ácido cítrico, 18 mmol/l, citrato de sódio, 9 mmol/l, cloreto de sódio, 12 mmol/l, com tensoativo, pH 3,6 $\pm$ 0,1 a 25 °C.

Solução de Acetato de α -naftilo (N.º de cat. 916-10ML)

Acetato de α -naftilo, 12,5 mg/ml, em solução de metanol com estabilizantes. Perigo. Líquido e vapor inflamáveis. Tóxico por ingestão. Nocivo em contacto com a pele ou por inalação. Provoca irritação cutânea ligeira. Provoca irritação ocular grave. Provoca danos nos órgãos.

Solução de Base azul rápida BB (N.º de cat. 917-10ML)

Base azul rápida BB, 15 mg/ml, C.I. 37175, em 0,4 mol/l de ácido clorídrico com estabilizadores. Aviso. Nocivo por ingestão. Provoca irritação cutânea ligeira. Provoca irritação ocular grave. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível.

Concentrado TRIZMAL™ 7,6 (N.º de cat. 918-50ML)

Maleato TRIZMA®, 1 mol/l, com tensoativo. pH 7,6 $\pm$ 0,15 a 25 °C. Perigo. Provoca irritação cutânea. Provoca lesões oculares graves. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Nocivo para os organismos aquáticos.

Solução de Hematoxilina, Gill N.º 3 (N.º de cat. GHS3-50ML)

Hematoxilina, certificada, 6,0 g/l, C.I. 75290, iodato de sódio, 0,6 g/l e sulfato de alumínio, 52,8 g/l, com estabilizadores. Perigo. Nocivo por ingestão. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Solução de Fluoreto de sódio (N.º de cat. 919-25ML)

Fluoreto de sódio, 20 g/l. Aviso. Nocivo por ingestão. Provoca irritação cutânea ligeira.

Materiais especiais necessários mas não fornecidos

- Acetona, Reagente ACS
- Formaldeído, 37%, ACS
- Solução de Fluoreto de sódio, N.º de cat. 919-25ML (Necessária para o procedimento de esterase de acetato de α -naftilo com inibição do fluoreto.)

Conservação e estabilidade

Conservar a Solução de Hematoxilina, Gill N.º 3, à temperatura ambiente (18-26 °C), protegida da luz. Conservar os outros reagentes no frigorífico (2-8 °C).

O Concentrado TRIZMAL™ 6,3, o Concentrado TRIZMAL™ 7,6 e a Solução de Citrato são adequados para utilização na ausência de crescimento microbiano. Os outros reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada no rótulo.

Deterioração

Eliminar o Concentrado TRIZMAL™ e a Solução de Citrato se o crescimento microbiano for evidente. Eliminar a Solução de Hematoxilina Gill N.º 3 se a solução ficar castanha (excesso de oxidação devido ao ar) ou roxa (perda de acidez).

Preparação

Aquecer todos os reagentes até à temperatura ambiente (18-26 °C) antes da utilização. Os reagentes de esterase são fornecidos prontos a utilizar.

Fixador de citrato-acetona-formaldeído: A 25 ml de Solução de citrato, adicionar 65 ml de Acetona e 8 ml de Formaldeído a 37%. Colocar em frasco de vidro e tapar firmemente. Conservar no frigorífico (2-8 °C). Deixar atingir a temperatura ambiente (18-26 °C) antes de utilizar. Estável durante até 4 semanas se conservado firmemente tapado no frigorífico.

Precauções

Os DIV incluídos nestes kits destinam-se a utilização para diagnóstico in vitro num ambiente de laboratório clínico. Estes DIV destinam-se apenas a utilização profissional por pessoal qualificado. Os DIV da Sigma-Aldrich podem ser utilizados por técnicos de laboratório com formação no manuseamento de amostras humanas potencialmente infecciosas e na utilização de microscópios e outros equipamentos laboratoriais e com perceção cromática e acuidade visual para distinguir cores e outros objetos ao microscópio.

Devem seguir-se as precauções normais no manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos cumprindo todos os regulamentos locais, estatais, municipais ou nacionais.

Procedimento

Colheita de amostras

Nenhum método de testagem conhecido pode oferecer uma garantia total de que as amostras sanguíneas ou tecido não transmitirão infeções. Por conseguinte, todos os derivados de sangue ou amostras de tecido devem ser considerados potencialmente infecciosos.

É possível utilizar sangue, películas de medula óssea, preparações por contacto de tecido e citocentrífuga com esterase de acetato de α -naftilo e esterase de cloroacetato de naftol AS-D. A EDTA ou heparina atuará como anticoagulante.⁹ É possível utilizar tecidos congelados e incluídos em parafina com esterase de cloroacetato de naftol AS-D. A esterase de acetato de α -naftilo pode ser utilizada com sucesso em secções de tecidos congelados.¹⁰ É possível conservar películas de sangue ou medula óssea fixadas à temperatura ambiente (18-26 °C) durante várias semanas ou não fixadas durante vários dias sem alteração apreciável da atividade.^{4,9} Não expedir sangue total para ensaio noutros laboratórios. Enviar lâminas fixadas ou não fixadas. As lâminas devem ser mantidos refrigeradas em trânsito. Permitir que as películas sequem durante, pelo menos, 1 hora antes da fixação.

Limitações do procedimento

Os procedimentos descritos são realizados a 37 °C. Se os reagentes não estiverem a esta temperatura, podem ser obtidas reações fracas ou negativas. Recomenda-se a verificação das temperaturas com um termómetro preciso. Os banhos-maria de temperatura controlada são mais eficientes do que as incubadoras de ar quente e devem ser utilizados em métodos de citotóxica enzimática. A transferência de calor através de vidro é mais rápida do que através de plástico, pelo que devem ser utilizadas jarras de Coplin de vidro.

Muitos sistemas enzimáticos são sensíveis a pequenos vestígios de detergente. A lavagem dos vidros com lixívia diluída, seguida de enxaguamento com água desionizada abundante, impede o efeito do detergente sobre as enzimas celulares.

O sistema fixador descrito na secção "Reagentes" contém formaldeído. Se o fixador não for removido na totalidade por uma lavagem vigorosa, qualquer quantidade de aldeído, quer concentrado em lâminas secas ao ar ou vestígios em lâminas húmidas, adicionada ao sistema de incubação, pode resultar na inibição enzimática. Para prevenir a perda de película de sangue durante o processo de enxaguamento, direcionar o fluxo de água para a lâmina acima do rebordo biselado. Enxaguar ambos os lados da lâmina.

Os resultados baseiam-se num determinado grau de interpretação subjetiva. Os laboratórios individuais devem estabelecer os seus próprios intervalos normais.

Notas

Os utilizadores dos Kits Sigma 390A e 91C devem ser cautelosos ao utilizar os Concentrados de Tampão TRIZMA®, N.º de catálogo 913 e 903C, uma vez que não são permutáveis. A utilização de um tampão incorreto resulta numa reação negativa.

Procedimento

Os procedimentos descritos são realizados a 37 °C.

Procedimento de Esterase de cloroacetato de naftol AS-D

1. Pré-aquecer água desionizada suficiente para uso no substrato até 37 °C. Verificar a temperatura antes de usar.
2. Imediatamente antes da fixação, adicionar 1 ml de Solução de pastilhas de Nitrito de sódio a 1 ml de Solução de Base vermelha violeta rápida LB. Misturar suavemente por inversão e deixar repousar durante 2 minutos. A evolução ativa das bolhas de gás deve ser evitada.
3. Adicionar solução do Passo 2 a 40 ml de água desionizada pré-aquecida do Passo 1.
4. Adicionar 5 ml de Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 6,3. (Consultar a "Nota")
5. Adicionar 1 ml de Solução de Cloroacetato de naftol AS-D. A solução deve ficar vermelha. Misturar bem e verter para a jarra de Coplin.
6. Aguardar até a Solução de Citrato-acetona-formaldeído (CAF) estar à temperatura ambiente (18-26 °C). Fixar as lâminas submergindo-as em Solução CAF durante 30 segundos.
7. Enxaguar cuidadosamente as lâminas em água desionizada corrente durante 45-60 segundos e, em seguida, colocar em solução do Passo 5. Não permitir que as lâminas sequem.
8. Incubar durante 15 minutos, a 37 °C, protegidas da luz.
9. Após 15 minutos, remover as lâminas e enxaguar cuidadosamente em água desionizada durante, pelo menos, 2 minutos.
10. Efetuar a contracoloração durante 2 minutos em Solução de Hematoxilina, Gill N.º 3.
11. Enxaguar em água da torneira e deixar secar ao ar.
12. Avaliar microscopicamente. Se for necessário utilizar lamelas, utilizar apenas um meio de montagem aquoso.

Notas

- Para utilização com jarras de Columbia, dividir os volumes de reagentes por 5.
- Se o substrato (Consultar o Passo 5) aparecer turvo, levar à temperatura ambiente (18-26 °C) e misturar bem.
- Se as lâminas tiverem sido pré-fixadas e armazenadas, saltar a fixação (Passos 6 e 7) e iniciar a coloração das lâminas secas, pré-fixadas no Passo 8.

Procedimento de Esterase de acetato de α-naftilo

1. Pré-aquecer água desionizada suficiente para uso no substrato até 37 °C. Verificar a temperatura antes de usar.
2. Imediatamente antes da fixação, adicionar 1 ml de Solução de pastilhas de Nitrito de sódio a 1 ml de Solução de Base azul rápida BB. Misturar por inversão e deixar repousar durante, pelo menos, 2 minutos. A cor muda de castanho sujo para amarelo profundo. A evolução ativa das bolhas de gás deve ser evitada.
3. Adicionar solução do Passo 2 a 40 ml de água desionizada pré-aquecida do Passo 1.
4. Adicionar 5 ml de Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 7,6.
5. Adicionar 1 ml de Solução de Acetato de α-naftilo. A solução deve ficar esverdeada. Misturar bem e verter para a jarra de Coplin.
6. Aguardar até a Solução de Citrato-acetona-formaldeído (CAF) estar à temperatura ambiente (18-26 °C). Fixar as lâminas submergindo-as em Solução CAF durante 30 segundos. Agitar vigorosamente as lâminas durante os últimos 5 segundos.
7. Enxaguar cuidadosamente as lâminas em água desionizada corrente durante 45–60 segundos e, em seguida, colocar em solução do Passo 5. Não permitir que as lâminas sequem.
8. Incubar durante 30 minutos, a 37 °C, protegidas da luz.
9. Após 30 minutos, remover as lâminas e enxaguar cuidadosamente durante, pelo menos, 2 minutos em água desionizada corrente.
10. Efetuar a contracoloração durante 2 minutos em Solução de Hematoxilina, Gill N.º 3.
11. Enxaguar em água da torneira e deixar secar ao ar.
12. Avaliar microscopicamente. Se for necessário utilizar lamelas, utilizar apenas um meio de montagem aquoso.

Notas

- Para utilização com jarras de Columbia, dividir os volumes de reagentes por 5.
- Se o substrato (Consultar o Passo 5) aparecer turvo, levar à temperatura ambiente (18-26 °C) e misturar bem.
- Se as lâminas tiverem sido pré-fixadas e armazenadas, saltar a fixação (Passos 6 e 7) e iniciar a coloração das lâminas secas, pré-fixadas no Passo 8.

Procedimento de coloração dupla da Esterase

1. Realizar o teste de Esterase de acetato de α-naftilo conforme descrito em Procedimento. Não efetuar a contracoloração.
2. Enxaguar a lâmina, durante 5 minutos, em água desionizada.
3. Realizar o teste de Esterase de cloroacetato de naftol AS-D conforme descrito nos Passos 1–12 do Procedimento. Omitir o Passo 6.

Nota

A Solução de Base azul rápida BB pode ser substituída pela Solução de Base vermelha violeta rápida LB se a granulação azul for preferível para a Esterase de cloroacetato de naftol AS-D.

Procedimento de esterase de acetato de α-naftilo com inibição do fluoreto

Embora a esterase de acetato de α-naftilo seja encontrada principalmente em células de linhagem monocítica quando o procedimento é realizado conforme descrito, deve ser reconhecido que os megacariócitos e precursores eritróides são positivos para esta enzima.¹¹ Os linfócitos e alguns granulócitos maduros exibem também uma positividade ocasional.⁴ Para diferenciar estas células conclusivamente dos monócitos, o fluoreto de sódio é incorporado com o sistema de incubação. A enzima do monócito é inativada na presença deste composto.¹² O seguinte procedimento pode ser utilizado para realizar o teste de inibição do fluoreto.

1. A 2 ml de Solução de Base azul rápida BB, adicionar 2 ml de Solução de Nitrito de sódio. Misturar suavemente por inversão. Deixar repousar durante 2 minutos.
2. Rotular dois copos A e B e adicionar o seguinte:

	Copo A	Copo B
Água desionizada pré-aquecida até 37 °C	40 ml	40 ml
Azul rápido BB diazotizado do Passo 1	2 ml	2 ml
Concentrado TRIZMAL™ 7,6	5 ml	5 ml
Solução de Acetato de α-naftilo	1 ml	1 ml
Solução de Fluoreto de sódio	-	1 ml

3. Misturar bem e verter para as jarras de Coplin rotuladas com A e B.
4. Prosseguir conforme descrito nos Passos 6–12 do Procedimento de Esterase de acetato de α-naftilo.

Características do desempenho

Método de classificação

Digitalizar a película e selecionar uma área fina com poucos eritrócitos. Os locais de atividade de Esterase de cloroacetato de naftol AS-D surgem como granulação vermelha brilhante, e a Esterase de acetato de α-naftilo como granulação preta. Classificar de 0 a 4+ com base na quantidade e intensidade de corantes individuais no citoplasma dos respetivos tipos de células. As características da classificação baseiam-se numa interpretação algo subjetiva. Um formato de classificação sugerido é apresentado na Tabela 1. As conclusões centram-se na presença relativa ou ausência de coloração.

Tabela 1. Características da classificação

Classificação das células	Intensidade da coloração	Interpretação
0+	Nenhum/a	–
1+	Ténue a moderada	±
2+	Moderada a forte	+
3+	Forte	+
4+	Brilhante	+

Observações esperadas

Esterase de cloroacetato de naftol AS-D

(Vermelho violeta rápido LB) – Geralmente, a enzima é considerada específica para células de linhagem granulocítica. Os locais de atividade exibem uma granulação vermelha brilhante. A atividade é fraca ou ausente em termos de monócitos e linfócitos.

Esterase de acetato de α-naftilo

(Azul rápido BB) - A enzima é detetada principalmente em monócitos, macrófagos e histiócitos e encontra-se virtualmente ausente em granulócitos. Os monócitos devem exibir granulação preta. Ocasionalmente, os linfócitos podem exibir atividade enzimática.

Coloração dupla da Esterase

As amostras obtidas através do procedimento de coloração dupla demonstram os granulócitos com granulação vermelha e os monócitos com granulação preta.

Esterase de acetato de α-naftilo com inibição do fluoreto

Todas as células de linhagem monocitária serão negativas para atividade enzimática, exceto os histiócitos diferenciados ou macrófagos especializados em tecidos que podem também ser resistentes ao fluoreto de sódio.¹⁰

Controlo de qualidade

O sistema de reagentes deve ser monitorizado através da utilização de lâminas de controlo positivo e negativo.

As lâminas de controlo positivo podem ser preparadas a partir de linhas celulares específicas conhecidas como positivas.

Alternativamente, também pode utilizar sangue anticoagulado de amostras normais (de preferência com aumento da contagem de monócitos se utilizar o procedimento esterase de acetato de α-naftilo); no entanto, elas fornecem uma coloração menos intensa e têm menos células positivas.

Podem ser utilizadas lâminas negativas conhecidas dos doentes como controlo negativo. Se não estiver disponível, a coloração de uma amostra numa mistura de incubação com o substrato omitido produzirá os resultados desejados. No entanto, a utilização da primeira é altamente recomendada.

Se os resultados observados variarem dos resultados previstos, contacte a Assistência técnica da Sigma-Aldrich para obter ajuda.

Características do desempenho analítico

Os resultados do desempenho analítico para os testes indicados realizados em todas as estruturas alvo, confirmam uma sensibilidade de 100%, especificidade e repetibilidade.

N.º de cat.	Descrição do produto	Alvo	Especificidade intraensaio	Sensibilidade intraensaio	Especificidade interensaio	Sensibilidade interensaio
911	Solução de Cloroacetato de naftol AS-D	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
912	Solução de Base vermelha violeta rápida LB	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
913	Concentrado TRIZMAL™ 6,3	Osmolalidade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
	pH		3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
914	Nitrito	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
915	Solução de Citrato	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
916	Solução de Acetato de α-naftilo	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
917	Solução de Base azul rápida BB	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
918	Concentrado TRIZMAL™ 7,6	Osmolalidade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
	pH		3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
919	Solução de Fluoreto de sódio	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
GHS3	Solução de Hematoxilina, Gill n.º 3	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Avisos e Perigos

Consulte a Folha de Dados de Segurança e a rotulagem do produto para obter informações atualizadas sobre riscos, perigos ou segurança.

91A:



H226 Líquido e vapor inflamáveis.

H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H301 Tóxico por ingestão.

H312 + H332 Nocivo em contacto com a pele ou por inalação.

H319 Provoca irritação ocular grave.

H370 Afeta os órgãos (Olhos, sistema nervoso central).

H412 Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar. Não fumar.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

P301 + P310 EM CASO DE INGESTÃO: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.

P304 + P340 + P312 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

91C:



- H290 Pode ser corrosivo para os metais.
- H302 Nocivo por ingestão.
- H315 Provoca irritação cutânea.
- H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
- H318 Provoca lesões oculares graves.
- H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.
- H360FD Pode afetar a fertilidade. Pode afetar o nascituro.
- H373 Pode afetar os órgãos (Rins) após exposição prolongada ou repetida em caso de ingestão.
- P202 Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.
- P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
- P301 + P312 EM CASO DE INGESTÃO: Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
- P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente com água.
- P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cautelosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
- P308 + P313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consulte um médico.

Caso tenha ocorrido algum incidente grave durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, comunique-o ao fabricante e/ou ao respetivo representante autorizado e à sua autoridade nacional.

Definições dos símbolos

Símbolos conforme definidos na norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar as instruções de utilização		Código do lote
	Representante autorizado na Comunidade Europeia/ União Europeia		Declaração de Conformidade da União Europeia (definida na diretiva RDIV 2017/746)
	Data de validade		Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Limite de temperatura		Atenção
	Data de fabrico		Importador
	Indica o Representante Autorizado na Suíça		

Referências

- Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
- Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
- Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Informações de contacto

Para encomendar, visite o nosso site em [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para Assistência técnica, visite a página de assistência técnica no nosso site [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Histórico de revisões

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Transferência para novo modelo com a marca atual. Especificação para utilização profissional na utilização prevista e nas precauções. Declaração de auxiliar de diagnóstico movida para a utilização prevista. Revisão da utilização prevista para alinhamento com as diretrizes do regulamento relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro (RDIV). Atualização de Folha de Dados de Segurança do Material para Folha de Dados de Segurança. Atualização das informações de contacto. Remoção da instrução para seguir o CLSI na colheita de amostras. Remoção da norma EN 980 e alteração para a norma EN ISO 15223-1:2021 nos símbolos. Adição de informações de contacto em caso de eventos adversos. Atualização das referências bibliográficas. Adição de uma tabela de histórico de revisões. Adição de Advertências e Perigos. Adicionadas informações CH-REP.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

O M inicial e Sigma-Aldrich são marcas comerciais da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha ou das respetivas afiliadas. Todas as outras marcas comerciais pertencem aos respetivos proprietários. Estão disponíveis informações detalhadas sobre marcas comerciais através de recursos acessíveis ao público.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Οδηγίες χρήσης

Κιτ α-ναφθουλ-οξικού λευκοκυττάρων (μη ειδική εστεράση) και Naphthol AS-D χλωροοξικού λευκοκυττάρων (ειδική εστεράση)

Διαδικασία αρ. 91



Προοριζόμενη χρήση

Τα κιτ Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης και α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης της Sigma-Aldrich προορίζονται ως ιστολογική χρώση γενικής εργαστηριακής χρήσης. Τα αντιδραστήρια Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης και α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης προορίζονται μόνο για επαγγελματική «in vitro διαγνωστική χρήση». Αυτή η μη αυτόματη, ποιοτική, ιστοχημική διαδικασία αναγνωρίζει τη δραστηριότητα της naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης και της α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης στα λευκοκύτταρα φίλμ ανθρώπινου αίματος, μυελού των οστών ή παρασκευασμάτων ιστών αποτυπωματικής κυτταρολογίας. Η ιστολογική οπτικοποίηση των κυτταρικών εστερασών λευκοκυττάρων είναι μια μοναδική τεχνική που επί του παρόντος χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική.

Οι κυτταρικές εστεράσες είναι πανταχού παρούσες και φαίνεται να αντιπροσωπεύουν μια σειρά διαφορετικών ενζύμων που δρουν σε επιλεγμένα υποστρώματα. Υπό καθορισμένες συνθήκες αντίδρασης, μπορεί να είναι δυνατός ο προσδιορισμός τύπων αιμοποιητικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας ειδικά υποστρώματα εστεράσης. Οι περιγραφόμενες μέθοδοι παρέχουν στους αιματολόγους και τους αιματοπαθολόγους μέσα για τη διάκριση των κοκκιοκυττάρων από τα μονοκύτταρα.¹⁻⁷

Για να πραγματοποιηθεί η δοκιμή, τα φίλμ αίματος, μυελού των οστών ή τα παρασκευάσματα ιστών αποτυπωματικής κυτταρολογίας επωάζονται είτε με naphthol AS-D χλωροοξικό (NCAE) είτε με α-ναφθουλ-οξικό (NAE) παρουσία ενός φρέσκου άλατος διαζωνίου. Η ενζυμική υδρόλυση των εστερικών δεσμών απελευθερώνει ελεύθερες ενώσεις ναφθόλης. Αυτές πραγματοποιούν σύζευξη με το άλας διαζωνίου, σχηματίζοντας έντονα χρωματισμένες εναποθέσεις στα σημεία ενζυμικής δραστηριότητας.

Οι πιο πρόσφατες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παρέχονται από τη Sigma-Aldrich, χρησιμοποιούν σταθερά άλατα διαζωνίου. Αυτά σχηματίζονται με αντίδραση μίας αρυλαμίνης με νιτρώδες νάτριο σε ένα δέινο μέσο.⁸ Το προκύπτον χλωριούχο διαζώνιο (συνήθως ασταθές) μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε επεξεργασία με ενώσεις όπως χλωριούχος ψευδάργυρος, θειικός ψευδάργυρος ή ναφθαλενο-1,6- δισουλφονικό, σχηματίζοντας σταθερά άλατα. Αυτοί οι σταθεροποιητές ενδέχεται να ασκούν έντονη ανασταλτική δράση σε ορισμένα ενζυμικά συστήματα, ενώ τα χλωριούχα διαζώνια είναι λιγότερο ανασταλτικά.⁹ Για αυτόν τον λόγο, η Sigma-Aldrich παρέχει πλέον σταθερά διαλύματα βάσης Fast Red Violet LB, βάσης Fast Blue BB και νιτρώδους νατρίου για την κυτταροχημεία της εστεράσης. Προκειμένου να απλοποιηθούν περαιτέρω αυτές οι μέθοδοι, περιλαμβάνονται επίσης σταθερά διαλύματα Naphthol AS-D χλωροοξικού και α-ναφθουλ-οξικού. Η διαθεσιμότητα αυτών των σταθερών διαλυμάτων επιτρέπει στον πελάτη να προσαρμόζει τους όγκους των αντιδραστηρίων εργασίας ανάλογα με τις ανάγκες, εξαιλεφώντας τα απόβλητα.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα Naphthol AS-D χλωροοξικού (Αρ. καταλόγου 911-10ML)

Naphthol AS-D χλωροοξικό, 8 mg/mL, και σταθεροποιητής. Προειδοποίηση. Προκαλεί οφθαλμικό ερεθισμό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλύνετε.

Διάλυμα βάσης Fast Red Violet LB (Αρ. καταλόγου 912-10ML)

Βάση Fast red violet LB, 15 mg/mL, σε 0,4 mol/L υδροχλωρικού οξέος με σταθεροποιητή. Κίνδυνος. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

Συμπύκνωμα TRIZMAL™ 6.3 (Αρ. καταλόγου 913-50ML)

TRIZMA® maleate, 1 mol/L, με επιφανειοδραστικό. pH 6,3 ± 0,15 στους 25 °C. Κίνδυνος. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

Διάλυμα νιτρώδους νατρίου (Αρ. καταλόγου 914-10ML)

Νιτρώδες νάτριο, 0,1 mol/L

Κιτρικό διάλυμα (Αρ. καταλόγου 915-50 ML)

Κιτρικό οξύ, 18 mmol/L, κιτρικό νάτριο, 9 mmol/L, χλωριούχο νάτριο, 12 mmol/L, με επιφανειοδραστικό. pH 3,6 ± 0,1 στους 25 °C

Διάλυμα α-ναφθουλ οξικού (Αρ. καταλόγου 916-10ML)

α-ναφθουλ-οξικό, 12,5 mg/mL, σε διάλυμα μεθανόλης με σταθεροποιητές. Κίνδυνος. Υγρό και ατμοί ευφλεκτά. Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής. Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Προκαλεί βλάβες στα όργανα.

Διάλυμα βάσης Fast Blue BB (Αρ. καταλόγου 917-10ML)

Βάση Fast blue BB, 15 mg/mL, C.I. 37175, σε 0,4 mol/L υδροχλωρικού οξέος με σταθεροποιητές. Προειδοποίηση. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο.

Συμπύκνωμα TRIZMAL™ 7.6 (Αρ. καταλόγου 918-50ML)

TRIZMA® maleate, 1 mol/L, με επιφανειοδραστικό. pH 7,6 ± 0,15 στους 25 °C. Κίνδυνος. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού. Επιβλαβές για τους υδράθριους οργανισμούς.

Διάλυμα αιματοξυλίνης Gill αρ. 3 (Αρ. καταλόγου GHS3-50ML)

Πιστοποιημένο αιματοξυλίνη, 6,0 g/L, C.I. 75290 ιωδικό νάτριο, 0,6 g/L και θειικό αργίλιο, 52,8 g/L, με σταθεροποιητές. Κίνδυνος. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

Διάλυμα φθοριούχου νατρίου (Αρ. καταλόγου 919-25ML)

Φθοριούχο νάτριο, 20 g/L. Προειδοποίηση. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.

Ειδικά υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Ακετόνη, αντιδραστήριο ACS
- Φορμαλδεΐδη, 37%, ACS
- Διάλυμα φθοριούχου νατρίου, Αρ. καταλόγου 919-25ML (Απαιτείται για τη διαδικασία της α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης με αναστολή φθορίου.)

Φύλαξη και σταθερότητα

Φυλάσσετε το διάλυμα αιματοξυλίνης Gill αρ. 3 σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C), προστατευμένο από το φως. Φυλάσσετε τα άλλα αντιδραστήρια σε ψυγείο (2–8 °C).

Το συμπύκνωμα TRIZMAL™ 6.3, το συμπύκνωμα TRIZMAL™ 7.6 και το κιτρικό διάλυμα είναι κατάλληλα για χρήση απουσία μικροβιακής ανάπτυξης. Τα άλλα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στις ετικέτες.

Αλλοίωση

Απορρίψτε το συμπύκνωμα TRIZMAL™ και το κιτρικό διάλυμα εάν υπάρχει ένδειξη ανάπτυξης μικροβίων. Απορρίψτε το διάλυμα αιματοξυλίνης Gill αρ. 3 εάν γίνει καφέ (υπεροξειδωση από τον αέρα) ή μοβ (απόλεια οξύτητας).

Παρασκευή

Θερμάνετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) πριν από τη χρήση. Τα αντιδραστήρια εστεράσης παρέχονται έτοιμα για χρήση.

Μονιμοποιητικό κιτρικού-ακετόνης-φορμαλδεΐδης: Σε 25 mL κιτρικού διαλύματος προσθέστε 65 mL ακετόνης και 8 mL φορμαλδεΐδης 37%. Τοποθετήστε σε γυάλινη φιάλη και κλείστε ερμητικά το καπάκι. Φυλάσσετε σε ψυγείο (2–8 °C). Φέρτε σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) πριν από τη χρήση. Σταθερό για έως 4 εβδομάδες, εάν φυλαχθεί σε ψυγείο με το καπάκι ερμητικά κλειστό.

Προφυλάξεις

Τα βοηθήματα IVD που περιλαμβάνονται σε αυτά τα κιτ προορίζονται για in vitro διαγνωστική χρήση σε περιβάλλον κλινικού εργαστηρίου. Αυτά τα βοηθήματα IVD προορίζονται για επαγγελματική χρήση μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό. Τα βοηθήματα IVD της Sigma-Aldrich μπορούν να χρησιμοποιούνται από εργαστηριακό προσωπικό το οποίο είναι εκπαιδευμένο να χειρίζεται ανθρώπινα δείγματα που μπορεί να είναι μολυσματικά, να χρησιμοποιεί μικροσκόπια και άλλον εργαστηριακό εξοπλισμό και διαθέτει αντίληψη των χρωμάτων και οπτική οξύτητα για να διακρίνει τα χρώματα και άλλα αντικείμενα κάτω από το μικροσκόπιο.

Πρέπει να ακολουθούνται οι συνθήκες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό εργαστηριακών αντιδραστηρίων. Απορρίψτε τα απόβλητα τηρώντας όλους τους τοπικούς, πολιτειακούς, περιφερειακούς ή εθνικούς κανονισμούς.

Διαδικασία

Συλλογή δειγμάτων

Καμία γνωστή μέθοδος δοκιμασίας δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διαβεβαίωση ότι τα δείγματα αίματος ή ιστού δεν θα μεταδώσουν λοίμωξη. Επομένως, όλα τα παράγωγα αίματος ή τα δείγματα ιστού θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά μολυσματικά.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν φίλμ αίματος, μυελού των οστών, παρασκευάσματα ιστών αποτυπωματικής κυτταρολογίας και παρασκευάσματα κυτταρο-φυγοκέντρησης τόσο με α-ναφθουλ-οξική εστεράση όσο και με naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση. Είτε το EDTA είτε η ηπαρίνη θα χρησιμοποιούνται ως αντιπηκτικά.⁹ Κατευθυνόμενοι και εγκλεισμένοι σε παραφινί ιστοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν με naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση. Η α-ναφθουλ-οξική εστεράση μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε κατεψυγμένες τομές ιστού.¹⁰ Τα φίλμ αίματος ή μυελού των οστών μπορούν να φυλαχθούν μονιμοποιημένα σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) για αρκετές εβδομάδες ή μη μονιμοποιημένα για αρκετές ημέρες χωρίς αισθητή αλλαγή στη δραστηριότητα.^{4,9} Μην αποστέλλετε πλήρες αίμα για ανάλυση σε άλλα εργαστήρια. Αποστέλλετε μονιμοποιημένες ή μη μονιμοποιημένες αντικειμενοφόρους. Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να διατηρούνται δροσερές κατά τη μεταφορά. Αφήστε τα φίλμ να στεγνώσουν τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη μονιμοποίηση.

Περιορισμοί της διαδικασίας

Οι περιγραφόμενες διαδικασίες εκτελούνται στους 37 °C. Εάν τα αντιδραστήρια δεν βρίσκονται σε αυτήν τη θερμοκρασία, μπορεί να προκύψουν ασθενείς ή αρνητικές αντιδράσεις. Συνιστάται ο έλεγχος της θερμοκρασίας με ένα θερμόμετρο ακριβείας. Το υδατόλουτρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας είναι πιο αποτελεσματικό από τους επιασμένους θερμίου αέρα και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για ενζυμικές κυτταροχημικές μεθόδους. Η μεταφορά θερμότητας μέσω του γυαλιού είναι πιο γρήγορη από ό, τι μέσω του πλαστικού, επομένως, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γυάλινα δοχεία Corlin.

Πολλά συστήματα ενζύμων είναι ευαίσθητα σε μικροσκοπικά ίχνη απορρυπαντικού. Το πλύσιμο των γυάλινων σκευών με αρωμαμένο λευκαντικό και κατόπιν το ξέπλυμα με άφθονες ποσότητες απιονισμένου νερού θα αποτρέψει την επίδραση του απορρυπαντικού στα κυτταρικά ενζύμα.

Το σύστημα μονιμοποίησης που περιγράφεται στην ενότητα «Αντιδραστήρια» περιέχει φορμαλδεΐδη. Εάν το μονιμοποιητικό δεν αφαιρεθεί πλήρως με έντονη έκπλυση, οποιαδήποτε ποσότητα αλδεΐδης, είτε συγκεντρωμένη σε αντικειμενοφόρους που έχουν στεγνώσει στον αέρα είτε ίχνη από υγρές αντικειμενοφόρους, η οποία προστίθεται στο σύστημα επώασης μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή του ενζύμου. Για να αποτρέψετε την απόλεια του φίλμ αίματος κατά τη διαδικασία έκπλυσης, κατευθύνετε τη ροή του νερού στην αντικειμενοφόρο επάνω από τη λεπτή άκρη. Ξεπλύνετε και τις δύο πλευρές της αντικειμενοφόρου.

Τα αποτελέσματα βασίζονται σε κάποιο βαθμό υποκειμενικής ερμηνείας. Το κάθε εργαστήριο θα πρέπει να ορίσει το δικό του φυσιολογικό εύρος.

Σημειώσεις

Οι χρήστες των κιτ Sigma 390A και 91C θα πρέπει να είναι προσεκτικοί όταν χρησιμοποιούν συμπυκνώματα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMA® με Αρ. καταλόγου 913 και 903C, καθώς δεν είναι εναλλάξιμα. Η χρήση εσφαλμένου ρυθμιστικού διαλύματος θα οδηγήσει σε αρνητική αντίδραση.

Διαδικασία

Οι περιγραφόμενες διαδικασίες εκτελούνται στους 37 °C.

Διαδικασία Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης

1. Προθερμάνετε αρκετό απιονισμένο νερό για χρήση στο υπόστρωμα στους 37 °C. Ελέγχετε τη θερμοκρασία πριν από τη χρήση.
2. Αμέσως πριν από τη μονιμοποίηση, προσθέστε 1 mL διαλύματος νιτρώδους νατρίου σε 1 mL διαλύματος βάσης Fast Red Violet LB σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο. Αναμείξτε ήπια με αναστροφή και αφήστε το μείγμα να παραμείνει σε ηρεμία για 2 λεπτά. Θα πρέπει να αποφεύγετε η ενεργή έκλυση φασαλίδων αερίου.
3. Προσθέστε το διάλυμα από το Βήμα 2 σε 40 mL προθερμασμένου απιονισμένου νερού από το Βήμα 1.
4. Προσθέστε 5 mL συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3. (Βλέπε «Σημείωση»)
5. Προσθέστε 1 mL διαλύματος Naphthol AS-D χλωροοξικού. Το διάλυμα θα πρέπει να γίνει κοκκινό. Αναμείξτε καλά και ρίξτε σε δοχείο Corlin.
6. Φέρτε το διάλυμα κιτρικού-ακετόνης-φορμαλδεΐδης (CAF) σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους με εμβάπτιση σε διάλυμα CAF για 30 δευτερόλεπτα.

- 7. Ξεπλύνετε καλά τις αντικειμενοφόρους σε τρεχούμενο αποιονισμένο νερό για 45–60 δευτερόλεπτα και μετά τοποθετήστε τις στο διάλυμα από το Βήμα 5. Μην αφήνεται τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
- 8. Επώστε τις για 15 λεπτά στους 37 °C, προστατευμένες από το φως.
- 9. Μετά από 15 λεπτά, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους και ξεπλύνετε καλά σε αποιονισμένο νερό για τουλάχιστον 2 λεπτά.
- 10. Πραγματοποιήστε αντίχρωση για 2 λεπτά σε διάλυμα αιματοξυλίνης, Gill αρ. 3.
- 11. Ξεπλύνετε σε νερό βρύσης και στεγνώστε στον αέρα.
- 12. Αξιολογήστε μικροσκοπικά. Εάν απαιτείται κάλυψη με καλυπτρίδα, χρησιμοποιήστε μόνο υδατικά μέσα κάλυψης.

Σημειώσεις

- Για χρήση με δοχεία Columbia, διαιρέστε τους όγκους του αντιδραστήριου με το 5.
- Εάν το υπόστρωμα (Βλ. Βήμα 5) φαίνεται θολό, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) και αναμείξτε καλά.
- Εάν οι αντικειμενοφόροι έχουν μονιμοποιηθεί και φυλαχθεί εκ των προτέρων, παραλείψτε τη μονιμοποίηση (Βήματα 6 και 7) και ξεκινήστε τη χρώση των στεγνών, προ-μονιμοποιημένων αντικειμενοφόρων στο Βήμα 8.

Διαδικασία α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης

- 1. Προθερμάνετε αρκετό αποιονισμένο νερό για χρήση στο υπόστρωμα στους 37 °C. Ελέγχετε τη θερμοκρασία πριν από τη χρήση.
- 2. Αμέσως πριν από τη μονιμοποίηση, προσθέστε 1 mL διαλύματος νιτρώδους νατρίου σε 1 mL διαλύματος βάσης Fast Blue BB σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο. Αναμείξτε με αναστροφή και αφήστε το μείγμα να παραμείνει σε ηρεμία για τουλάχιστον 2 λεπτά. Το χρώμα θα αλλάξει από μουντό καφέ σε βαθύ κίτρινο. Θα πρέπει να αποφεύγεται η ενεργή έκλυση φυσαλίδων αερίου.
- 3. Προσθέστε το διάλυμα από το Βήμα 2 σε 40 mL προθερμασμένου αποιονισμένου νερού από το Βήμα 1.
- 4. Προσθέστε 5 mL συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6.
- 5. Προσθέστε 1 mL διαλύματος α-ναφθουλ-οξικού. Το διάλυμα θα πρέπει να γίνει πρασινωπό. Αναμείξτε καλά και ρίξτε σε δοχείο Corlin.
- 6. Φέρτε το διάλυμα κιτρικού-ακετόνης-φορμαλδεΐδης (CAF) σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους με εμφύπτιση σε διάλυμα CAF για 30 δευτερόλεπτα. Αναδέστε έντονα τις αντικειμενοφόρους τα τελευταία 5 δευτερόλεπτα.
- 7. Ξεπλύνετε καλά τις αντικειμενοφόρους σε τρεχούμενο αποιονισμένο νερό για 45–60 δευτερόλεπτα και μετά τοποθετήστε τις στο διάλυμα από το Βήμα 5. Μην αφήσετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
- 8. Επώστε τις για 30 λεπτά στους 37 °C, προστατευμένες από το φως.
- 9. Μετά από 30 λεπτά, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους και ξεπλύνετε καλά για τουλάχιστον 2 λεπτά σε τρεχούμενο αποιονισμένο νερό.
- 10. Πραγματοποιήστε αντίχρωση για 2 λεπτά σε διάλυμα αιματοξυλίνης, Gill αρ. 3.
- 11. Ξεπλύνετε σε νερό βρύσης και στεγνώστε στον αέρα.
- 12. Αξιολογήστε μικροσκοπικά. Εάν απαιτείται κάλυψη με καλυπτρίδα, χρησιμοποιήστε μόνο υδατικά μέσα κάλυψης.

Σημειώσεις

- Για χρήση με δοχεία Columbia, διαιρέστε τους όγκους του αντιδραστήριου με το 5.
- Εάν το υπόστρωμα (Βλ. Βήμα 5) φαίνεται θολό, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) και αναμείξτε καλά.
- Εάν οι αντικειμενοφόροι έχουν μονιμοποιηθεί και φυλαχθεί εκ των προτέρων, παραλείψτε τη μονιμοποίηση (Βήματα 6 και 7) και ξεκινήστε τη χρώση των στεγνών, προ-μονιμοποιημένων αντικειμενοφόρων στο Βήμα 8.

Διαδικασία εστεράσης διπλής χρώσης

- 1. Εκτελέστε τη δοκιμή α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης όπως περιγράφεται στη Διαδικασία. Μην πραγματοποιείτε αντίχρωση.
- 2. Ξεπλύνετε την αντικειμενοφόρο για 5 λεπτά σε αποιονισμένο νερό.
- 3. Εκτελέστε τη δοκιμή Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης όπως περιγράφεται στα Βήματα 1-12 της Διαδικασίας. Παραλείψτε το βήμα 6.

Σημείωση

Το διάλυμα βάσης Fast Blue BB μπορεί να αντικατασταθεί με το διάλυμα βάσης Fast Red Violet LB, εάν προτιμάται η ηπλή κοκκίωση για τη Naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση.

Διαδικασία α-ναφθουλ οξικής εστεράσης με αναστολή φθορίου

Παρόλο που η α-ναφθουλ-οξική εστεράση απαντάται κυρίως σε κύτταρα μονοκυτταρικής καταγωγής όταν εκτελείται όπως περιγράφεται, θα πρέπει να αναγνωριστεί ότι τα μεγακαρυοκύτταρα και τα πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα είναι θετικά για αυτό το ένζυμο.¹¹ Τα λεμφοκύτταρα και ορισμένα ώριμα κοκκιοκύτταρα παρουσιάζουν επίσης περιστασιακή θετικότητα.⁴ Για να διαφοροποιηθούν οριστικά αυτά τα κύτταρα από τα μονοκύτταρα, το φθοριούχο νάτριο ενσωματώνεται στο σύστημα επίασης.¹² Το ένζυμο των μονοκυττάρων αδρανοποιείται παρουσία αυτής της ένωσης.¹² Η ακόλουθη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση της δοκιμής αναστολής φθορίου.

- 1. Σε 2 mL διαλύματος βάσης Fast Blue BB προσθέστε 2 mL διαλύματος νιτρώδους νατρίου. Αναμείξτε ήπια με αναστροφή. Αφήστε το μείγμα να παραμείνει σε ηρεμία για 2 λεπτά.
- 2. Επισημάνετε 2 ποτήρια ως Α και Β και προσθέστε τα ακόλουθα:

	Ποτήρι Α	Ποτήρι Β
Αποιονισμένο νερό, προθερμασμένο στους 37 °C	40 mL	40 mL
Διαζωτωμένο Fast Blue BB από το Βήμα 1	2 mL	2 mL
Συμπύκνωμα TRIZMAL™ 7.6	5 mL	5 mL
Διάλυμα α-ναφθουλ οξικού	1 mL	1 mL
Διάλυμα φθοριούχου νατρίου	-	1 mL

- 3. Αναμείξτε καλά και ρίξτε σε δοχεία Corlin με επισημάνση Α και Β.
- 4. Προχωρήστε όπως περιγράφεται στα Βήματα 6-12 της διαδικασίας α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τρόπος βαθμολόγησης

Σαρώστε το φίλμ και επιλέξτε μια λεπτή περιοχή με λίγα ερυθροκύτταρα. Τα σημεία δραστηριότητας της Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης θα εμφανίζονται ως κοκκίωση με έντονο κόκκινο χρώμα και της η α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης ως κοκκίωση με μαύρο χρώμα. Βαθμολογήστε από 0 έως 4+ με βάση την ποσότητα και την ένταση των επιμέρους χρωστικών των αντίστοιχων τύπων κυττάρων μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τα χαρακτηριστικά της Βαθμολογίας βασίζονται σε κάποιο βαθμό υποκειμενικής ερμηνείας. Μια προτεινόμενη μορφή βαθμολόγησης παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Τα συμπεράσματα επικεντρώνονται στη σχετική παρουσία ή απουσία χρώσης.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά βαθμολογίας

Βαθμολογία κυττάρου	Ένταση χρώσης	Ερμηνεία
0+	Καθόλου	–
1+	Αμυδρή έως μέτρια	±
2+	Μέτρια έως έντονη	+
3+	Έντονη	++
4+	Πολύ έντονη	+++

Αναμενόμενες παρατηρήσεις

Naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση

(Fast Red Violet LB) - Αυτό το ένζυμο θεωρείται συνήθως ειδικό για κύτταρα κοκκιοκυτταρικής καταγωγής. Τα σημεία δραστηριότητας εμφανίζουν έντονη κόκκινη κοκκίωση. Η δραστηριότητα είναι ασθενής ή απουσιάζει στα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα.

α-ναφθουλ-οξική εστεράση

(Fast Blue BB) - Αυτό το ένζυμο ανιχνεύεται κυρίως σε μονοκύτταρα, μακροφάγα και ιστιοκύτταρα, και ουσιαστικά απουσιάζει στα κοκκιοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα πρέπει να εμφανίζουν μαύρη κοκκίωση. Τα λεμφοκύτταρα μπορεί περιστασιακά να παρουσιάζουν ενζυμική δραστηριότητα.

Εστεράση διπλής χρώσης

Τα δείγματα που λαμβάνονται μέσω της διαδικασίας διπλής χρώσης θα εμφανίζουν τα κοκκιοκύτταρα με κόκκινη κοκκίωση και τα μονοκύτταρα με μαύρη κοκκίωση.

α-ναφθουλ οξική εστεράση με αναστολή φθορίου

Όλα τα κύτταρα μονοκυτταρικής καταγωγής θα είναι αρνητικά για ενζυμική δραστηριότητα, με εξαίρεση τα διαφοροποιημένα ιστιοκύτταρα ή τα εξειδικευμένα μακροφάγα στον ιστό, που μπορεί επίσης να είναι ανθεκτικά στο φθοριούχο νάτριο.¹⁰

Έλεγχος ποιότητας

Το σύστημα αντιδραστήριων θα πρέπει να παρακολουθείται με τη χρήση θετικών και αρνητικών αντικειμενοφόρων ελέγχου.

Οι θετικές αντικειμενοφόροι ελέγχου μπορούν να παρασκευαστούν από συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές που είναι γνωστό ότι είναι θετικές.

Εναλλακτικά, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί αίμα με αντιπηκτικά από φυσιολογικά δείγματα (κατά προτίμηση με αυξημένο αριθμό μονοκυττάρων, εάν χρησιμοποιείται διαδικασία α-ναφθουλ οξικής εστεράσης). Ωστόσο, θα παρέχουν λιγότερο έντονη χρώση και θα έχουν λιγότερα θετικά κύτταρα.

Οι γνωστές αρνητικές αντικειμενοφόροι ασθενών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικός έλεγχος. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμες, η χρώση ενός δείγματος σε ένα μείγμα επίασης παραλείποντας το υπόστρωμα θα δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ωστόσο, η χρήση του πρώτου συνιστάται ανεπιφύλακτα.

Εάν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα διαφέρουν από τα αναμενόμενα, επικοινωνήστε με την τεχνική υπηρεσία της Sigma-Aldrich για βοήθεια.

Χαρακτηριστικά απόδοσης της ανάλυσης

Τα αποτελέσματα απόδοσης της ανάλυσης για τις δεδομένες δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε όλες τις στοχευόμενες δομές, επιβεβαιώνουν την ευαισθησία, την ειδικότητα και την επαναληψιμότητα σε ποσοστό 100%.

Αρ. κατα-λόγου	Περιγραφή προϊόντος	Στόχος	Ειδικότητα εντός της ανάλυσης	Ευαισθησία εντός της ανάλυσης	Ειδικότητα μεταξύ των αναλύσεων	Ευαισθησία μεταξύ των αναλύσεων
911	Διάλυμα Naphthol AS-D χλωροοξικού	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
912	Διάλυμα βάσης Fast Red Violet LB	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
913	Συμπύκνωμα TRIZMAL™ 6.3	Οσμωτικότητα	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
		pH	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
914	Διάλυμα νιτρώδους νατρίου	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
915	Κιτρικό διάλυμα	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
916	Διάλυμα α-ναφθουλ οξικού	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
917	Διάλυμα βάσης Fast Blue BB	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
918	Συμπύκνωμα TRIZMAL™ 7.6	Οσμωτικότητα	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
		pH	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
919	Διάλυμα φθοριούχου νατρίου	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
GHS3	Διάλυμα αιματοξυλίνης, Gill αρ. 3	Πυρήνες	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3

Προειδοποιήσεις και κίνδυνοι

Ανατρέξτε στο Δελτίο δεδομένων ασφαλείας και στην επισήμανση προϊόντος για οποιαδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνων ή ασφάλειας.

91A:



- H226 Υγρό και ατμοί εύφλεκτα.
- H290 Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.
- H301 Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης.
- H312 + H332 Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής.
- H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
- H370 Προκαλεί βλάβες στα όργανα (μάτια, κεντρικό νευρικό σύστημα).
- H412 Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.
- P210 Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες, σπινθήρες, γυμνές φλόγες και άλλες πηγές ανάφλεξης. Μην καπνίζετε.
- P273 Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.
- P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.
- P301 + P310 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.
- P303 + P361 + P353 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Βγάλτε αμέσως όλα τα μολυσμένα ρούχα. Ξεπλύνετε την επιδερμίδα με νερό.
- P304 + P340 + P312 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό, αν αισθανθείτε αδιαθεσία.

91C:



- H290 Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.
- H302 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.
- H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
- H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
- H318 Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.
- H335 Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
- H360FD Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα. Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.
- H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα όργανα (νεφροί) ύστερα από παρατεταμένη ή επανειλημμένη έκθεση, σε περίπτωση κατάποσης.
- P202 Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης.
- P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.
- P301 + P312 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό, αν αισθανθείτε αδιαθεσία.
- P302 + P352 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.
- P305 + P351 + P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.
- P308 + P313 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.

Εάν, κατά τη διάρκεια της χρήσης αυτού του βοηθήματος ή ως αποτέλεσμα της χρήσης του, έχει συμβεί κάποιο σοβαρό περιστατικό, παρακαλείστε να το αναφέρετε στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στην εθνική αρχή της χώρας σας.

Ορισμοί συμβόλων

Σύμβολα όπως ορίζονται στο EN ISO 15223-1:2021

	Κατασκευαστής		Αριθμός καταλόγου
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Αριθμός παρτίδας
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα/ Ευρωπαϊκή Ένωση		Δήλωση συμμόρφωσης Ευρωπαϊκής Ένωσης (όπως ορίζεται στην οδηγία IVDR 2017/746)
	Ημερομηνία λήξης		In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Όριο θερμοκρασίας		Προσοχή
	Ημερομηνία παραγωγής		Εισαγωγέας
	Υποδεικνύει τον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπο στην Ελβετία		

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974

2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975

3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972

4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971

5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974

6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957

7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960

8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113

9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130

10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38

11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111

12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για να κάνετε μια παραγγελία, παρακαλούμε επισκεφθείτε τον ιστότοπό μας στη διεύθυνση [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Για τεχνική εξυπηρέτηση, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη σελίδα τεχνικής εξυπηρέτησης στον ιστότοπό μας στη διεύθυνση [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Ιστορικό αναθεωρήσεων

Αναθ. 4.0	2014
Αναθ. 5.0	2016
Αναθ. 6.0	2023

Έγινε μεταφορά σε νέο υπόδειγμα με την τρέχουσα επωνυμία. Προσδιορίστηκε για επαγγελματική χρήση στην προοριζόμενη χρήση και τις προφυλάξεις. Η προοριζόμενη χρήση αναθεωρήθηκε για ευθυγράμμιση με τις κατευθυντήριες γραμμές IVDR. Το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού ενημερώθηκε σε Δελτίο δεδομένων ασφαλείας. Ενημερώθηκαν οι πληροφορίες επικοινωνίας. Αφαιρέθηκε η οδηγία να ακολουθείται το CLSI για τη συλλογή δειγμάτων. Αφαιρέθηκε το EN 980 και άλλαξε σε EN ISO 15223-1:2021 για τα σύμβολα. Προστέθηκαν πληροφορίες επικοινωνίας για ανειδίκευτα συμβάντα. Ενημερώθηκαν οι βιβλιογραφικές αναφορές. Προστέθηκε πίνακας ιστορικού αναθεωρήσεων. Προσθήκη προειδοποιήσεων και κινδύνων. Προστέθηκαν πληροφορίες εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου για την Ελβετία (CH-REP).

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Το αρχικό γράμμα M και το Sigma-Aldrich είναι εμπορικά σήματα της Merck KGaA, Darmstadt, Germany ή των συνδεδεμένων με αυτήν εταιρειών. Όλα τα άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα είναι διαθέσιμες μέσω δημοσίων προσβάσιμων πόρων.

Használati utasítás

Leukocita α-naftil-acetát (nem specifikus észteráz) és leukocita naftol-AS-D-klóracetát (specifikus észteráz) készlet

91. sz. eljárás



Rendeltetésszerű használat

A Sigma-Aldrich naftol-AS-D-klóracetát-észteráz és α-naftil-acetát-észteráz készlet általános laboratóriumi felhasználásra szánt szövettani festék. A naftol-AS-D-klóracetát-észteráz és α-naftil-acetát-észteráz reagenskizárólag „*in vitro* diagnosztikai felhasználásra” szolgálnak. Ez a manuális, kvalitatív hisztokémiai eljárás kimutatja a naftol-AS-D-klóracetát-észteráz és α-naftil-acetát-észteráz aktivitást az emberi vérkenetekben, csontvelőkenetekben és szövetlenymat-preparátumokban lévő leukocitákban. A leukocita celluláris észterázok szövettani megjelenítése egy egyedülálló, az orvostudományban jelenleg általánosan használt technika.

A celluláris észterázok mindenütt jelen vannak, és úgy tűnik, olyan különböző enzimek sorát képviselik, amelyek bizonyos szubsztátokra hatnak. Meghatározott reakciókörülmények között, adott észterázszubsztátok felhasználásával lehetőség nyílik a hemopoetikus sejttípusok meghatározására. A leírt módszerek segítséget nyújtanak a hematológus és hematopatológus szakemberek számára a granulociták és monociták megkülönböztetése során.¹⁻⁷

A vizsgálat elvégzéséhez a vér-, a csontvelőkeneteket vagy a szövetlenymat-preparátumokat frissen készített diazóniumsó jelenlétében naftol-AS-D-klóracetáttal (NCAE) vagy α-naftil-acetáttal (NAE) kell inkubálni. Az észterázok enzimatiak hidrolízise naftolvegületeket szabadít fel. Ezek kötődnek a diazóniumsókhoz, erősen festett lerakódásokat képezve az enzimaktivitás helyén.

A legtöbb új eljárás, beleértve a Sigma-Aldrich által biztosított eljárást is, stabil diazóniumsók alkalmaz. Ezeket egy arilamin vegyület és a nátrium-nitrit savas közegben történő reakciójával hozzák létre.⁸ A keletkező diazónium-klorid (általában instabil) ezután olyan vegyületekkel kezelhető, mint a cink-klorid, a cink-szulfát vagy a naftalén-1,6-diszulfonát, így stabil sók képződnek. Ezek a stabilizátorok jelentős gátlást fejthetnek ki egyes enzimrendszerekre, míg a diazónium-kloridok kevésbé gátló hatásúak.⁹ Ezért a Sigma-Aldrich a Fast Red Violet LB bázis, Fast Blue BB bázis és nátrium-nitrit esetén stabil oldatokat biztosít az észteráz kimutatását célzó citokémiai vizsgálatokhoz. A módszerek további egyszerűsítése érdekében a rendszer a naftol-AS-D-klóracetát és az α-naftil-acetát stabil oldatait is tartalmazza. Ezen stabil oldatok elérhetősége lehetővé teszi a felhasználók számára, hogy a munkareagens mennyiségét az igényeknek megfelelően állítsák be, így csökkentve a hulladékmennyiséget.

Reagens

Naftol-AS-D-klóracetát oldat (kat. sz.: 911-10ML)

Naftol-AS-D-klóracetát (8 mg/ml) és stabilizálószer. Figyelmeztetés. Szemirritációt okoz. SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

Fast Red Violet LB bázis oldata (kat. sz.: 912-10ML)

Fast Red Violet LB bázis, 15 mg/ml, sósavban (0,4 mol/l), stabilizálószerrel. Vesztély. Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz. Védőkesztyű/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

TRIZMAL™ 6.3 koncentráum (kat. sz.: 913-50ML)

Naftol-AS-D-klóracetát, 1 mol/l, felületaktív anyaggal. A pH-érték 25 °C-on 6,3 ± 0,15. Vesztély. Bőrirritáló hatású. Allergiás bőrreakciók válthat ki. Súlyos szemkárosodást okoz. Védőkesztyű/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Nátrium-nitrit oldat (kat. sz.: 914-10ML)

Nátrium-nitrit, 0,1 mol/l.

Citrátoldat (kat. sz.: 915-50ML)

Citromsav, 18 mmol/l; nátrium-citrát, 9 mmol/l; nátrium-klorid, 12 mmol/l és felületaktív anyag, pH-érték 25 °C-on 3,6 ± 0,1

α-naftil-acetát oldat (kat. sz.: 916-10ML)

α-naftil-acetát, 12,5 mg/ml, stabilizálószerrel tartalmazó metanolos oldatban. Vesztély. Tűzvesztélyes folyadék és gőz. Lenyelve mérgező. Bőrrrel érintkezve vagy belélegezve ártalmas. Enyhén bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Károsítja a szerveket.

Fast Blue BB bázis oldata (kat. sz.: 917-10ML)

Fast Blue BB bázis, 15 mg/ml, sósavban (0,4 mol/l), stabilizálószerrel. Figyelmeztetés. Lenyelve ártalmas. Enyhén bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható.

TRIZMAL™ 7.6 koncentráum (kat. sz.: 918-50ML)

TRIZMA® maleát, 1 mol/l, felületaktív anyaggal. A pH-érték 25 °C-on 7,6 ± 0,15. Vesztély. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Légúti irritációt okozhat. Ártalmas a vízi élővilágra.

Hematoxilinoldat, Gill III (kat. sz.: GHS3-50ML)

Tanúsított hematoxilin, 6,0 g/l, C.I. 75290; nátrium-jodát, 0,6 g/l; alumínium-szulfát, 52,8 g/l és stabilizálószer. Vesztély. Lenyelve ártalmas. Súlyos szemkárosodást okoz. Védőkesztyű/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Nátrium-fluorid oldat (kat. sz.: 919-25ML)

Nátrium-fluorid, 20 g/l. Figyelmeztetés. Lenyelve ártalmas. Enyhén bőrirritáló hatású.

Szükséges, de nem biztosított speciális anyagok

- Aceton, ACS-reagensminőség
- Formaldehid, 37%, ACS
- Nátrium-fluorid oldat, kat. sz.: 919-25ML (a fluoridgátlással kiegészített α-naftil-acetát-észteráz eljáráshoz szükséges)

Tárolás és stabilitás

A Gill III-as hematoxilinoldatot szobahőmérsékleten (18–26 °C), fénytől védve kell tárolni. A többi reagens hűtőszekrényben tárolandó (2–8 °C).

A TRIZMAL™ 6.3 koncentráum, a TRIZMAL™ 7.6 koncentráum és a citrátoldat mikrobiális növekedés hiányában használható. A többi reagens a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil.

Bomlás

Ha a mikrobiális növekedés nyilvánvaló, dobja ki a TRIZMAL™ koncentrátumot és a citrátoldatot. Dobja ki a Gill III-as hematoxilinoldatot, ha az oldat megbarnul (túloxidálódott a levegőn) vagy ilává válik (savasság elvesztése).

Előkészítés

Használat előtt melegítse szoba-hőmérsékletre (18–26 °C) az összes reagenst. Az észteráz kimutatásához használt reagenskizárólag készek.

Citrát-aceton-formaldehid fixáló: 25 ml citrátoldathoz adjon 65 ml acetont és 8 ml 37%-os formaldehidet. Tegye üvegtartályba, és szorosan zárja le kupakkal. Hűtőszekrényben tárolandó (2–8 °C). Használat előtt szoba-hőmérsékletre (18–26 °C) kell melegíteni. Hűtőszekrényben, szorosan lezárva tárolva 4 hétig stabil.

Óvintézkedések

Az ezekben a készletekben található *in vitro* diagnosztikai eszközöket klinikai laboratóriumi környezetben történő *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szánták. Ezeket az *in vitro* diagnosztikai eszközöket csak képzett szakemberek használhatják. A Sigma-Aldrich *in vitro* diagnosztikai eszközöket olyan laboratóriumi személyzet üzemeltetheti, akik képzettek az esetlegesen fertőző emberi minták kezelésére, mikroszkópok és egyéb laboratóriumi berendezések használatában, valamint kellő színérzékeléssel és látásélességgel rendelkeznek a színek és egyéb tárgyak mikroszkóp alatt történő megkülönböztetésére.

A laboratóriumi reagenskizárólag kezelés során a szokásos óvintézkedéseket kell követni. A hulladékokat a helyi, állami, tartományi vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Eljárás

Mintavétel

Egyetlen ismert vizsgálati módszer sem nyújt teljes bizonyosságot arra nézve, hogy a vérminták vagy szövetek nem továbbítanak fertőzést. Ezért minden vérvizsgálatot vagy szövetmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

Mind az α-naftil-acetát-észterázzal, mind a naftol-AS-D-klóracetát-észterázzal használható vér-, csontvelőkeneteket, szövetlenymat-preparátumok és sejtcentrifugálással nyert minták is. Antikoagulánsként EDTA vagy heparin alkalmazható.⁹ A fagyasztott és a paraffinba ágyazott szövetek jól használhatók naftol-AS-D-klóracetát-észterázzal. Az α-naftil-acetát-észteráz megfelelően használható fagyasztott szövetmetszeteken.¹⁰ A vér- vagy csontvelőkeneteket fixált állapotban szobahőmérsékleten (18–26 °C) több hétig, vagy fixálás nélkül több napig tárolhatók aktivitásváltozás nélkül.^{4,9} Ne szállítson teljes vért más laboratóriumokba vizsgálat céljából. Fixált vagy nem fixált tárgylemezeket is küldhet. A tárgylemezeket szállítás közben hidegen kell tartani. A keneteket a fixálás előtt legalább 1 óráig hagyja száradni.

Az eljárás korlátai

A leírt eljárásokat 37 °C-on kell elvégezni. Ha a reagenskizárólag nem ezen a hőmérsékleten vannak, az gyenge vagy negatív reakciót eredményezhet. Javasolt a hőmérsékleteket pontos hőmérővel ellenőrizni. A szabályozott hőmérsékletű vízfürdők hatékonyabbak, mint a meleg levegős inkubátorok, ezért az enzim-citokémiai módszerekhez ezeket kell használni. Az üvegen keresztüli hőátadás gyorsabb, mint a műanyagon keresztüli hőátadás, ezért üveg küvetákat kell használni.

Számos enzimrendszer kis mennyiségű tisztítószert jelenlétére is érzékeny. Az üvegedények hig fehérítőszerral történő mosásával, majd bőseges mennyiségű ioncserélt vízzel történő öblítésével megelőzhető a tisztítószerek sejtenzimekre gyakorolt hatása.

A „Reagenskizárólag” részben leírt fixálórendszer formaldehidet tartalmaz. Ha a fixálót nem távolítják el teljesen alapos öblítéssel, akkor az inkubációs rendszerbe bekerülő (akár levegőn szárított tárgylemezek koncentráltan, akár a nedves tárgylemezek nyomokban található) bármilyen kis mennyiségű aldehid enzimgátlást okozhat. Az öblítési folyamat során a vérkenet sérülésének megelőzése érdekében irányítsa a vízáramot a lemez végén lévő vékony kenetréteg feletti részre. Öblítse le a tárgylemez mindkét oldalát.

Az eredmények bizonyos fokig szubjektív értelmezésen alapulnak. Az egyes laboratóriumoknak meg kell határozniuk saját normál tartományjaikat.

Megjegyzések

A 390A és 91C Sigma-készlet felhasználóinak körültekintően kell eljárniuk a TRIZMA® pufferkoncentrátumok (kat. sz.: 913 és 903C) használatakor, mivel ezek nem cserélhetők fel egymással. A nem megfelelő puffer használata negatív reakciót eredményez.

Eljárás

A leírt eljárásokat 37 °C-on kell elvégezni.

Naftol-AS-D-klóracetát-észteráz eljárás

1. Melegítsen elő a szubsztát alkalmazásához elegendő mennyiségű ioncserélt vizet 37 °C-ra. Használat előtt ellenőrizze a hőmérsékletet.
2. Közvetlenül a fixálás előtt adjon 1 ml nátrium-nitrit oldatot 1 ml Fast Red Violet LB bázis oldathoz egy tesztcsőben. Forgatással finoman keverje össze, és hagyja állni 2 percig. El kell kerülni a gázbuborékok aktív kialakulását.
3. Adja hozzá a 2. lépésben leírt oldatot 40 ml előmelegített ioncserélt vízhez (1. lépés).
4. Adjón hozzá 5 ml TRIZMAL™ 6.3 pufferkoncentrátumot (Lásd „Megjegyzés”).
5. Adjón hozzá 1 ml naftol-AS-D-klóracetát oldatot. Az oldatnak pirossá kell válnia. Alaposan keverje össze, és öntse küvetába.
6. Melegítse a citrát-aceton-formaldehid (CAF) oldatot szoba-hőmérsékletre (18–26 °C). Fixálja a tárgylemezeket 30 másodpercig a CAF oldatba merítve.
7. Alaposan öblítse a tárgylemezeket folyó ioncserélt vízben 45–60 másodpercig, majd helyezze őket az 5. lépésben leírt oldatba. Ne hagyja, hogy a lemezek megszáradjanak.
8. Inkubálja őket 15 percig 37 °C-on, fénytől védve.
9. 15 perc elteltével távolítsa el a tárgylemezeket, és alaposan öblítse őket ioncserélt vízzel legalább 2 percig.

- Végezzen ellenfestést Gill III-as hematoxinolindattal 2 percig.
- Öblítse a lemezeket csapvízzel, és szárítsa őket levegőn.
- Végezze el a lemezek mikroszkópos értékelését. Ha fedőlemezelés szükséges, csak vizes fedőközeget használjon.

Megjegyzések

- A Columbia festőedényekkel való használatához ossza el a reagensmennyiséget 5-tel.
- Ha a szubsztrát (lásd 5. lépés) zavarosnak tűnik, helyezze szobahőmérsékletre (18–26 °C), és jól keverje össze.
- Ha a tárgylemezeket előzetesen fixálták, majd tárolták, hagyja ki a fixálást (6. és 7. lépés), és kezdje a száraz, előzetesen fixált tárgylemezek festését a 8. lépés szerint.

α-naftil-acetát-észteráz eljárás

- Melegítsen elő a szubsztrát alkalmazásához elegendő mennyiségű ioncserélt vizet 37 °C-ra. Használat előtt ellenőrizze a hőmérsékletet.
- Közvetlenül a fixálás előtt adjon 1 ml nátrium-nitrit oldatot 1 ml Fast Blue BB bázis oldathoz egy tesztcsőben. Forgatással keverje össze, és hagyja állni legalább 2 percig. A szín piszkosbarnáról mélysárgára változik. El kell kerülni a gázbuborékok aktív kialakulását.
- Adja hozzá a 2. lépésben leírt oldatot 40 ml előmelegített ioncserélt vízhez (1. lépés).
- Adjon hozzá 5 ml TRIZMAL™ 7,6 pufferkoncentrátumot.
- Adjon hozzá 1 ml α-naftil-acetát oldatot. Az oldatnak zöldessé kell válnia. Alaposan keverje össze, és öntse küvétába.
- Melegítse a citrát-aceton-formaldehid (CAF) oldatot szoba-hőmérsékletűre (18–26 °C). Fixálja a tárgylemezeket 30 másodpercig a CAF oldatba merítve. Az utolsó 5 másodpercben erőteljesen rázza a lemezeket.
- Alaposan öblítse a tárgylemezeket folyó ioncserélt vízben 45–60 másodpercig, majd helyezze őket az 5. lépésben leírt oldatba. Ne hagyja, hogy a lemezek megszáradjanak.
- Inkubálja őket 30 percig 37 °C-on, fénytől védve.
- 30 perc elteltével távolítsa el a tárgylemezeket, és alaposan öblítse őket folyó ioncserélt vízzel legalább 2 percig.
- Végezzen ellenfestést Gill III-as hematoxinolindattal 2 percig.
- Öblítse a lemezeket csapvízzel, és szárítsa őket levegőn.
- Végezze el a lemezek mikroszkópos értékelését. Ha fedőlemezelés szükséges, csak vizes fedőközeget használjon.

Megjegyzések

- A Columbia festőedényekkel való használatához ossza el a reagensmennyiséget 5-tel.
- Ha a szubsztrát (lásd 5. lépés) zavarosnak tűnik, helyezze szobahőmérsékletre (18–26 °C), és jól keverje össze.
- Ha a tárgylemezeket előzetesen fixálták, majd tárolták, hagyja ki a fixálást (6. és 7. lépés), és kezdje a száraz, előzetesen fixált tárgylemezek festését a 8. lépés szerint.

Észteráz eljárás kettős festéssel

- Végezze el az α-naftil-acetát-észteráz tesztet az Eljárás részben leírtak szerint. Ne végezzen ellenfestést.
- Öblítse a tárgylemezt 5 percig ioncserélt vízzel.
- Végezze el a naftol-AS-D-klóracetát-észteráz tesztet az Eljárás rész 1–12. lépésének megfelelően. Hagyja ki a 6. lépést.

Megjegyzés

A Fast Red Violet LB bázis oldat helyett Fast Blue BB bázis oldat is alkalmazható, ha a naftol-AS-D-klóracetát-észteráz esetében kék szemcsézettséget kívánnak elérni.

α-naftil-acetát-észteráz eljárás fluoridgátlással

Bár az α-naftil-acetát-észteráz elsősorban a monocitikus sejtvonalból származó sejtekben található meg – ha a leírtak szerint végzik az eljárást –, figyelembe kell venni, hogy a megakariociták és az eritroid prekurzorok is pozitívan erre az enzimre.¹¹ A limfociták és néhány érett granulocita esetenként szintén pozitív.* Ahhoz, hogy ezeket a sejteket egyértelműen meg lehessen különböztetni a monocitáktól, nátrium-fluoridot kell alkalmazni az inkubációs rendszerben. A monocita enzim ezen vegyület jelenlétében inaktíválódik.¹² A következő eljárás használható a fluoridgátlási teszt elvégzésére.

- 2 ml Fast Blue BB bázis oldathoz adjon 2 ml nátrium-nitrit oldatot. Finoman fel-le forgatva keverje össze. Hagyja állni 2 percig.
- Címkezzzen fel 2 A és B főzőpoharat, és adja hozzá a következőket:

	A főzőpohár	B főzőpohár
37 °C-ra előmelegített ioncserélt víz	40 ml	40 ml
Diazotált Fast Blue BB az 1. lépésből	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7.6 koncentrátum	5 ml	5 ml
α-naftil-acetát oldat	1 ml	1 ml
Nátrium-fluorid oldat	-	1 ml

- Alaposan keverje össze, és öntse egy-egy A és B jelzésű küvetába.
- Végezze el az α-naftil-acetát-észteráz tesztet az Eljárás rész 6–12. lépéseinek megfelelően.

Teljesítményjellemzők

A pontozás módja

Vizsgálja meg a kenetet, és válasszon ki egy vékony területet kevés eritrocitával. A naftol-AS-D-klóracetát-észteráz aktivitásának helyei élénkvrórs szemcsékként, az α-naftil-acetát-észteráz aktivitásának helyei pedig fekete szemcsékként jelennek meg. Az adott sejtípus citoplazmájában lévő egyes festékek mennyisége és intenzitása alapján osztályozza a sejteket 0 és 4+ között. A pontozás jellemzői némileg szubjektív értelmezésen alapulnak. A javasolt pontozási mód az 1. táblázatban látható. A következtetések fókuszában a festődés relatív jelenléte vagy hiánya áll.

- táblázat Pontozási jellemzők

Sejt értékelése	Festődés intenzitása	Értelmezés
0+	Nincs	-
1+	Halvány-közepes	±
2+	Közepes-erős	+
3+	Erős	+
4+	Ragyogó	+

Várható megfigyelések

Naftol-AS-D-klóracetát-észteráz

(Fast Red Violet LB) – Az enzimet általában a granulocitikus sejtvonal sejtjeire specifikusnak tekintik. Az aktivitási helyek élénkvrórs szemcsézettséget mutatnak. Monocitákban és limfocitákban az aktivitás gyenge vagy nincs.

α-naftil-acetát-észteráz

(Fast Blue BB) – Az enzim elsősorban a monocitákban, a makrofágokban és a hisztiocitákban mutatható ki, és gyakorlatilag hiányzik a granulocitákból. A monocitáknak fekete szemcsézettséget kell mutatniuk. A limfociták esetenként mutathatnak enzimaktivitást.

Észteráz eljárás kettős festéssel

A kettős festési eljárás során nyert minták vrórs szemcsézettséggel jelenítik meg a granulocitákat és fekete szemcsézettséggel a monocitákat.

α-naftil-acetát-észteráz fluoridgátlással

A monocitikus sejtvonal minden sejtje negatív lesz enzimaktivitásra, kivéve a differenciálódott hisztiocitákat vagy specializálódott szöveti makrofágokat, amelyek szintén rezisztensek lehetnek a nátrium-fluoridra.¹⁰

Minőség-ellenőrzés

A reagensrendszert pozitív és negatív kontroll tárgylemezek használatával kell ellenőrizni.

Pozitív kontroll tárgylemezek készíthetők ismertén pozitív specifikus sejtvonalakból.

Alternatív megoldásként normál mintákból származó antikoagulált vér is felhasználható (az α-naftil-acetát-észteráz eljárás alkalmazása esetén lehetőleg emelkedett monocitaszámmal), ezek azonban kevésbé intenzív festődést mutatnak, és kevesebb pozitív sejtet tartalmaznak.

Az ismertén negatív betegektől származó tárgylemezek negatív kontrollként használhatók. Ha nem áll ilyen rendelkezésre, a minta szubsztrátmentes inkubációs keverékben történő festése is a kívánt eredményt adja. Mindazonáltal erősen ajánlott az első megoldás használata.

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várt eredményektől, kérjük, forduljon a Sigma-Aldrich műszaki szolgálatához segítségért.

Analitikai teljesítményjellemzők

Az adott tesztek analitikai teljesítményjellemzői az összes célstruktúrán vizsgálva 100% érzékenységet, specifitást és ismételhetőséget igazoltak.

Kat. sz.	Termékleírás	Cél	Tesztben belüli specifitás	Tesztben belüli érzékenység	Tesztek közötti specifitás	Tesztek közötti érzékenység
911	Naftol-AS-D-klóracetát oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
912	Fast Red Violet LB bázis oldata	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
913	TRIZMAL™ 6.3 koncentrátum	Ozmolalítás	3/3	3/3	3/3	3/3
		pH	3/3	3/3	3/3	3/3
914	Nátrium-nitrit oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
915	Citrátoldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
916	α-naftil-acetát oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
917	Fast Blue BB bázis oldata	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
918	TRIZMAL™ 7.6 koncentrátum	Ozmolalítás	3/3	3/3	3/3	3/3
		pH	3/3	3/3	3/3	3/3
919	Nátrium-fluorid oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
GHS3	Hematoxinolindat, Gill III	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3

Figyelmeztetések és veszélyek

A frissített kockázati, veszélyességi és biztonsági információkért olvassa el a biztonsági adatlapot és a termék címkézését.

91A:



H226 Tűzvesélyes folyadék és gőz.

H290 Fémekre korrozív hatású lehet.

H301 Lenyelve mérgező.

H312 + H332 Bőrrel érintkezve vagy belélegezve ártalmas.

H319 Súlyos szemirritációt okoz.

H370 Károsítja a szerveket (szemek, központi idegrendszer).

H412 Ártalmas a vízi élővilágra, hosszán tartó károsodást okoz.

P210 Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás.

P273 Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

P301 + P310 LENYELÉS ESETÉN: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.

P303 + P361 + P353 HA BŐRRE (vagy hajra) KERÜL: Az összes szennyezett ruhadarabot azonnal le kell vetni. A bőrt le kell öblíteni vízzel.

P304 + P340 + P312 BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.

91C:



- H290 Fémekre korrozív hatású lehet.
- H302 Lenyelve ártalmas.
- H315 Bőrirritáló hatású.
- H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.
- H318 Súlyos szemkárosodást okoz.
- H335 Légúti irritációt okozhat.
- H360FD Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a születendő gyermeket.
- H373 Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén lenyelve károsíthatja a szerveket (vese).
- P202 Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
- P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
- P301 + P312 LENYELÉS ESETÉN: Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
- P302 + P352 HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel.
- P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
- P308 + P313 Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Orvosi ellátást kell kérni.

Ha az eszköz használata során vagy annak használata következtében súlyos baleset történt, kérjük, jelentse azt a gyártónak és/vagy meghatalmazott képviselőjének és a helyi nemzeti hatóságnak.

Jelmagyarázat

Az EN ISO 15223-1:2021 szabványban meghatározott jelek

	Gyártó		Katalógusszám
	Lásd a használati utasítást		Gyártási tétel kódja
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közöségben/ Európai Unióban		Az Európai Unió megfelelőségi nyilatkozata (az IVDR 2017/746 meghatározása szerint)
	Lejárat dátum		In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Hőmérsékleti határértékek		Vigyázat!
	Gyártási dátum		Importőr
	A svájci hivatalos képviselőt jelöli		

Hivatkozások

- Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974.
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975.
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972.
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971.
- Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957.
- Moloney WC, McPherson K, Sliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Elérhetőségek

Megrendelés leadásához látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Műszaki segítségért látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Átdolgozási előzmények

Rev.: 4.0	2014
Rev.: 5.0	2016
Rev.: 6.0	2023

Áthelyezve az új sablonba a jelenlegi márkajelzéssel. A professzionális használatra vonatkozó megállapítás leírása a rendeltetésszerű használat és az óvintézkedések részekben. A rendeltetésszerű használatra vonatkozó részek átdolgozása az IVDR irányelveknek való megfelelés érdekében. Az Anyagbiztonsági adatlap frissítése Biztonsági adatlpra. Az elérhetőségek frissítése. A mintagyűjtés során a CLSI követésére vonatkozó utasítás eltávolítása. Az EN 980-as szabvány szerinti jelzések eltávolítása és az EN ISO 15223-1:2021 szabvány jelzéseire változtatása. A nemkívánatos eseményekkel kapcsolatos elérhetőségek hozzáadása. Frissített szakirodalmi hivatkozások. Átdolgozási előzménytáblázat hozzáadása. Figyelmeztetések és veszélyek hozzáadása. A CH-REP információ hozzáadva.

	Sigma-Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany +1(314) 771-5765		MDSS GmbH Schiffgraben 41 30175 Hannover, Germany		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
	MDSS CH GmbH Laurenzenvordstadt 61 5000 Aarau Switzerland				

Az „M” kezdőbetű a Sigma-Aldrich a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) vagy leányvállalatainak védjegyei. Minden egyéb védjegy a megfelelő tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekre vonatkozó részletes információk nyilvánosan hozzáférhető forrásokon keresztül érhető el.

Návod k použití

Souprava pro leukocytární α -naftylacetát (nespecifická esteráza) a leukocytární naftyl AS-D chloroacetát (specifická esteráza)

Postup č. 91



Určené použití

Soupravy Sigma-Aldrich Naftol AS-D Chloroacetátová esteráza a α -naftylacetátová esteráza jsou určeny jako histologické barvivo pro všeobecné laboratorní použití. Reagencie pro chloroacetát esterázu Naftol AS-D a α -naftylacetát esterázu jsou určeny pouze pro profesionální, diagnostické použití in vitro. Tento manuální, kvalitativní, histochemický postup prokazuje aktivitu naftol AS-D chloroacetát esterázy a α -naftylacetát esterázy v leukocytech lidské krve, ve filmech kostní dřevě nebo v tkáňových dotykových preparátech. Histologická vizualizace leukocytárních buněčných esteráz je unikátní technikou, která se v současnosti v medicíně běžně používá.

Buněčné esterázy jsou všudypřítomné a zdá se, že zastupují řadu různých enzymů působících na vybrané substráty. Za definovaných reakčních podmínek může být možné určit typy hemopoetických buněk za použití specifických substrátů esteráz. Popsané metody poskytují hematologům a hematopatologům prostředky k rozlišení granulocytů od monocytů.¹⁻⁷

K provedení testu se inkubují nátěry krve či kostní dřevě nebo tkáňové preparáty buď pomocí naftol AS-D chloroacetátu (NCAE), nebo pomocí α -naftylacetátu (NAE) za přítomnosti čerstvě vytvořené diazoniové soli. Enzymatická hydrolyza esterových vazeb uvolňuje volné naftolové sloučeniny. Ty se spojují s diazoniovou solí a vytvářejí v místech enzymatické aktivity vysoce barevná ložiska.

Většina novějších postupů, včetně postupů poskytovaných společností Sigma-Aldrich, používá stabilní diazoniové soli. Ty vznikají reakcí arylaminu s dusitanem sodným v kyselém prostředí.⁸ Výsledný chlorid diazonny (obvykle nestabilní) pak může být ošetřen sloučeninami, jako je chlorid zinečnatý, síran zinečnatý nebo naftalen-1,6-disulfonát, za vzniku stabilních solí. Tyto stabilizátory mohou výrazně inhibovat některé enzymatické systémy, zatímco chloridy diazonné jsou méně inhibiční.⁸ Z tohoto důvodu nyní společnost Sigma-Aldrich poskytuje pro cytochemii esterázy stabilní roztoky základu Fast Red Violet LB, základu Fast Blue BB a dusitanu sodného. Pro další zjednodušení těchto metod jsou zahrnuty stabilní roztoky naftol AS-D chloroacetátu a α -naftylacetátu. Dostupnost těchto stabilních roztoků umožňuje zákazníkovi přizpůsobit objemy činidel konkrétním potřebám, a eliminovat tak odpad.

Činidla

Roztok naftol AS-D chloroacetátu (kat. č. 911-10ML)

Naftol AS-D chloroacetát, 8 mg/ml a stabilizátor. Varování. Způsobuje podráždění očí. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyjmout. Pokračujte ve vyplachování.

Základní roztok Fast Red Violet LB (kat. č. 912-10ML)

Základní roztok Fast Red Violet LB, 15 mg/ml, v 0,4 mol/l kyseliny chlorovodíkové se stabilizátorem. Nebezpečí. Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje.

Koncentrát TRIZMAL™ 6.3 (kat. č. 913-50ML)

TRIZMA® maleát, 1 mol/l, s povrchově aktivní látkou. pH 6,3 ± 0,15 při 25 °C. Nebezpečí. Způsobuje podráždění kůže. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné poškození očí. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje.

Roztok dusitanu sodného (kat. č. 914-10ML)

Dusitan sodný, 0,1 mol/l

Roztok citrátu (kat. č. 915-50ML)

Kyselina citronová, 18 mmol/l, citronan sodný, 9 mmol/l, chlorid sodný, 22 mmol/l, s povrchově aktivní látkou, pH 3,6 ± 0,1 při 25 °C

Roztok α -naftylacetátu (kat. č. 916-10ML)

α -naftylacetát, 12,5 mg/ml, v methanolem roztoku se stabilizátory. Nebezpečí. Hořlavá kapalina a pára. Toxický při požití. Zdraví škodlivý při styku s kůží nebo při vdechování. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Způsobuje poškození orgánů.

Základní roztok Fast Blue BB (kat. č. 917-10ML)

Základní roztok Fast Blue BB, 15 mg/ml, C.I. 37175, v 0,4 mol/l kyselině chlorovodíkové se stabilizátory. Varování. Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyjmout.

Koncentrát TRIZMAL™ 7.6 (kat. č. 918-50ML)

TRIZMA® maleát, 1 mol/l, s povrchově aktivní látkou. pH 7,6 ± 0,15 při 25 °C. Nebezpečí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné poškození očí. Při vdechování může způsobit příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Škodlivý pro vodní organismy.

Roztok hematoxylinu podle Gilla č. 3 (kat. č. GHS3-50ML)

Certifikovaný hematoxylin, 6,0 g/l, C.I. 75290 jodičnan sodný, 0,6 g/l, a síran hlinitý, 52,8 g/l, se stabilizátory. Nebezpečí. Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje vážné poškození očí. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje.

Roztok fluoridu sodného (kat. č. 919-25ML)

Fluorid sodný, 20 g/L. Varování Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje podráždění kůže.

Potřebné speciální materiály, které nejsou součástí dodávky

- Aceton, ACS činidlo
- Formaldehyd, 37%, ACS
- Roztok fluoridu sodného, kat. č. 919-25ML (vyžadováno pro postup prokázání α -naftylacetát esterázy s inhibicí fluoridů)

Skládování a stabilita

Uchovávejte roztok hematoxylinu podle Gilla č. 3 při pokojové teplotě (18–26 °C) a chráňte před světlem. Uchovávejte ostatní činidla v chladničce (2–8 °C).

Koncentrát TRIZMAL™ 6.3, koncentrát TRIZMAL™ 7.6 a roztok citrátu jsou vhodné pro použití, pokud nedochází k mikrobiálnímu růstu. Ostatní činidla jsou stabilní do data spotřeby uvedeného na štítcích.

Znehodnocení

Pokud je patrný mikrobiální růst, koncentrát TRIZMAL™ a roztok citrátu zlikvidujte. Pokud roztok hematoxylinu podle Gilla č. 3 zhnědne (nadměrně oksyločený ze vzduchu) nebo zfaloví (ztráta kyselosti), zlikvidujte jej.

Příprava

Před použitím zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu (18–26 °C). Činidla esterázy jsou dodávána připravená k použití.

Fixační prostředek citrát-aceton-formaldehyd: Do 25 ml roztoku citrátu přidejte 65 ml acetonu a 8 ml 37% formaldehydu. Vložte do skleněné lahvičky a pevně uzavřete. Uchovávejte v chladničce (2–8 °C). Před použitím zahřejte na pokojovou teplotu (18–26 °C). Stabilní až 4 týdny, pokud je uchovávan pevně uzavřený v chladničce.

Bezpečnostní opatření

Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro obsažené v těchto soupravách jsou určeny pro diagnostické použití in vitro v klinickém laboratorním prostředí. Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pouze pro profesionální použití kvalifikovaným personálem. Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro Sigma-Aldrich mohou být používány laboratorními pracovníky, kteří jsou vyškoleni k manipulaci s lidskými vzorky, které mohou být infekční, k používání mikroskopů a jiného laboratorního vybavení a jejich barevné vidění a ostrost zraku jsou dostatečné pro rozlišení barev a různých objektů pod mikroskopem.

Při zacházení s laboratorními činidly dodržujte běžná bezpečnostní opatření. Odpad zlikvidujte podle všech místních, regionálních či národních předpisů.

Postup

Odběr vzorků

Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout naprosté ujištění, že vzorky krve nebo tkáně nebudou zdrojem infekce. Všechny krevní deriváty nebo vzorky tkání je proto nutné považovat za potenciálně infekční.

S α -naftylacetát esterázou i naftol AS-D chloracetát esterázou lze použít nátěry krve a kostní dřevě, tkáňové preparáty a cytocentrifugační preparáty. Jako antikoagulant poslouží buď EDTA, nebo heparin.⁹ Zmrazené tkáně a tkáně zalité v parafínu mohou být použity s naftol AS-D chloroacetát esterázou. α -naftylacetát esteráza může být úspěšně použita na zmrazených částech tkání.¹⁰ Nátěry krve nebo kostní dřevě mohou být skladovány zafixované při pokojové teplotě (18–26 °C) po dobu několika týdnů nebo bez fixace po dobu několika dnů bez znetlazení změny aktivity.^{4,6} Neodeslejte celou krev k vyšetření do jiných laboratoří. Poslejte fixovaná nebo nefixovaná sklička. Sklička by měla být během přepravy uchovávána v chladu. Nechejte nátěry uschnout nejméně 1 hodinu před fixací.

Omezení postupu

Popsané postupy se provádějí při teplotě 37 °C. Nedosahují-li činidla této teploty, lze dosáhnout slabých nebo negativních reakcí. Doporučuje se kontrolovat teplotu přesným teploměrem. Vodní lázně s řízenou teplotou jsou účinnější než teplovzdušné inkubátory a měly by se používat pro enzymatické cytochemické metody. Přenos tepla přes sklo je rychlejší než přes plast, proto by měly být použity Coplinovy nádoby.

Mnoho systémů pro prokazování enzymů je citlivých na nepatrné stopy detergentu. Mytí skleněných nádobí ředěným bílým, následované opláchnutím velkým množstvím deionizované vody, zabrání působení detergentu na buněčné enzymy.

Fixační systém popsán v části „Činidla“ obsahuje formaldehyd. Pokud fixační prostředek nebude zcela odstraněn důkladným opláchnutím, může jakékoli množství aldehydu, buď koncentrovaného na skličkách vysušená na vzduchu, nebo ve stopových množstvích z mokřých skliček, vést při přidání do inkubačního systému k inhibici enzymů. Abyste zabránili ztrátě krevního nátěru během oplachování, nasměrujte proud vody na skličku nad zúženou hranu. Opláchněte obě strany sklička.

Výsledky jsou založeny na určitém stupni subjektivní interpretace. Jednotlivé laboratoře by si měly stanovit vlastní normální rozmezí.

Poznámky

Uživatelé souprav Sigma 390A a 91C by měli být při používání pufrčních koncentrátů TRIZMA®, katalogová čísla 913 a 903C, opatrní, protože tyto koncentráty nejsou zaměnitelné. Použití nesprávného pufru bude mít za následek negativní reakci.

Postup

Popsané postupy se provádějí při teplotě 37 °C.

Postup pro naftol AS-D chloroacetát esterázu

- Předehřejte dostatečné množství deionizované vody pro použití na substrátu na 37 °C. Před použitím zkontrolujte teplotu.
- Bezprostředně před fixací přidejte 1 ml roztoku dusitanu sodného do 1 ml základního roztoku Fast Red Violet LB ve zkumavce. Jemně promíchejte překlápěním a nechte odstat 2 minuty. Je třeba zabránit aktivní tvorbě plynových bublin.
- Přidejte roztok z kroku 2 do 40 ml předehřáté deionizované vody z kroku 1.
- Přidejte 5 ml pufrčního koncentráту TRIZMAL™ 6.3. (Viz „Poznámka“)
- Přidejte se 1 ml roztoku naftol AS-D chloroacetátu. Roztok by měl zčervenat. Dobře promíchejte a nalijte do Coplinovy nádoby.
- Přiveďte roztok citrát-aceton-formaldehyd (CAF) na pokojovou teplotu (18–26 °C). Zafixujte sklička ponořením do CAF na 30 sekund.
- Důkladně opláchněte sklička tekoucí deionizovanou vodou po dobu 45–60 sekund a poté je umístěte do roztoku z kroku 5. Nedovolte, aby sklička vyschla.
- Inkubujte 15 minut při teplotě 37 °C, chráněné před světlem.
- Po 15 minutách sklička vyjměte a důkladně opláchněte v deionizované vodě po dobu nejméně 2 minut.
- Kontrastně barvěte po dobu 2 minut v roztoku hematoxylinu dle Gilla č. 3.
- Opláchněte ve vodě z vodovodu a vysušte vzduchem.
- Mikroskopicky vyhodnoťte. Pokud je vyžadováno krycí skličko, použijte pouze vodné montážní médium.

Poznámky

- Pro použití s nádobami Columbia vydělte objemy činidla 5.
- Pokud se substrát (viz krok 5) jeví zakalený, ohřejte jej na pokojovou teplotu (18–26 °C) a dobře promíchejte.
- Pokud byly sklička předfixována a uložena, přeskočte fixaci (kroky 6 a 7) a začněte barvit suchá, předfixovaná sklička v kroku 8.

Postup pro α-naftylacetát esterázu

1. Předehejte dostatečné množství deionizované vody pro použití na substrátu na 37 °C. Před použitím zkontrolujte teplotu.
2. Bezprostředně před fixací přidejte 1 ml roztoku dusitanu sodného do 1 ml základního roztoku Fast Blue BB ve zkumavce. Promíchejte překlápěním a nechte odstát alespoň 2 minuty. Barva se změní ze špinavě hnědé na tmavě žlutou. Je třeba zabránit aktivní tvorbě plynových bublin.
3. Přidejte roztok z kroku 2 do 40 ml předeheaté deionizované vody z kroku 1.
4. Přidejte 5 ml pufrálního koncentrátu TRIZMAL™ 7.6.
5. Přidejte 1 ml roztoku α-naftylacetátu. Roztok by měl zezelenat. Dobře promíchejte a nalijte do Coplinovy nádoby.
6. Přiveďte roztok citrát-aceton-formaldehyd (CAF) na pokojovou teplotu (18–26 °C). Zafixujte sklíčka ponořením do CAF na 30 sekund. Posledních 5 sekund sklíčka důkladně protřepávejte.
7. Důkladně opláchněte sklíčka tekoucí deionizovanou vodou po dobu 45–60 sekund a poté je umístěte do roztoku z kroku 5. Nedovolte, aby sklíčka vyschla.
8. Inkubujte 30 minut při teplotě 37 °C, chráněně před světlem.
9. Po 30 minutách sklíčka vyjměte a důkladně opláchněte v tekoucí deionizované vodě po dobu nejméně 2 minut.
10. Kontrastně barvěte po dobu 2 minut v roztoku hematoxylinu dle Gilla č. 3.
11. Opláchněte ve vodě z vodovodu a vysušte vzduchem.
12. Mikroskopicky vyhodnoťte. Pokud je vyžadováno krycí sklíčko, používejte pouze vodné montážní médium.

Poznámky

- Pro použití s nádobami Columbia vydělte objemy činidla 5.
- Pokud se substrát (viz krok 5) jeví zakalený, ohřejte jej na pokojovou teplotu (18–26 °C) a dobře promíchejte.
- Pokud byly sklíčka předfixována a uložena, přeskočte fixaci (kroky 6 a 7) a začněte barvit suchá, předfixovaná sklíčka v kroku 8.

Postup dvojitého barvení esterázy

1. Proveďte test na α-naftylacetát esterázu, jak je popsáno v postupu. Neprovádějte kontrastní barvení.
2. Opláchněte sklíčko v deionizované vodě po dobu 5 minut.
3. Proveďte test na naftol AS-D chloracetát esterázu, jak je popsáno v krocích 1-12 postupu. Vynechte krok 6.

Poznámka

Základní roztok Fast Blue BB může být nahrazen základním roztokem Fast Red Violet LB, pokud je pro naftol AS-D chloracetát esterázu upřednostňována modrá granulace.

Postup prokázání α-naftylacetát esterázy s inhibicí fluoridů

Ačkoli je α-naftylacetát esteráza zjištěna především v buňkách monocytární linie, pokud je postup proveden podle popisu, je třeba rozpoznat, že jsou megakaryocyty a erytroidní prekurzory pro tento enzym pozitivní.¹¹ Lymfocyty a některé zralé granulocyty také vykazují příležitostnou pozitivitu.⁴ Pro jednoznačné odlišení těchto buněk od monocytů je do inkubačního systému začleněn fluorid sodný. Enzym monocytů je v přítomnosti této sloučeniny inaktivován.¹² K provedení testu inhibice fluoridů lze použít následující postup.

1. Do 2 ml základního roztoku Fast Blue BB přidejte 2 ml roztoku dusitanu sodného. Jemně zamíchejte překlápěním. Nechte 2 minuty odstát.
2. Označte 2 kádinky A a B a přidejte následující:

	Kádinka A	Kádinka B
Deionizovaná voda předeheatá na 37 °C	40 ml	40 ml
Diazotizovaný Fast Blue BB z kroku 1	2 ml	2 ml
Koncentrát TRIZMAL™ 7.6	5 ml	5 ml
Roztok α-naftylacetátu	1 ml	1 ml
Roztok fluoridu sodného	-	1 ml

3. Dobře promíchejte a nalijte do Coplinových nádob označených A a B.
4. Postupujte podle popisu v krocích 6–12 postupu pro na α-naftylacetát esterázu.

Pracovní charakteristiky

Metoda hodnocení

Naskenujte náter a vyberte tenkou oblast s malým počtem erytrocytů. Místa aktivity naftol AS-D-chloracetát esterázy se zobrazí jako jasně červená granulace, místa aktivity α-naftylacetát esterázy jako černá granulace. Ohodnoťte body od 0 do 4+ na základě množství a intenzity jednotlivých barviv v cytoplazmě příslušných typů buněk. Charakteristiky hodnocení jsou do značné míry založeny na subjektivní interpretaci. Navrhovaný formát hodnocení je uveden v tabulce 1. Závěry se zaměřují na relativní přítomnost nebo nepřítomnost zbarvení.

Tabulka 1. Charakteristiky hodnocení

Hodnocení buňky	Intenzita barvení	Interpretace
0+	Žádné	–
1+	Slabé až střední	±
2+	Střední až silné	+
3+	Silné	+
4+	Brilantní	+

Očekávaná pozorování

Naftol AS-D chloracetát esteráza

(Fast Red Violet LB) - Enzym je obvykle považován za specifický pro buňky granulocytární linie. Místa aktivity vykazují jasně červenou granulaci. Aktivita v monocytech a lymfocytech je slabá nebo chybí.

α-naftylacetát esteráza

(Fast Blue BB) - Enzym je detekován především v monocytech, makrofázích a histiocytech, zatímco v granulocytech prakticky chybí. Monocyty by měly vykazovat černou granulaci. Lymfocyty mohou občas vykazovat enzymatickou aktivitu.

Dvojité barvení esterázy

Vzorky odebrané během postupu dvojitého barvení prokáží granulocyty červenou granulací a monocyty černou granulací.

Prokázání α-naftylacetát esterázy s inhibicí fluoridů

Všechny buňky monocytární linie budou negativní na aktivitu enzymů, s výjimkou diferencovaných histiocytů nebo specializovaných makrofágů ve tkáni, které mohou být také rezistentní vůči fluoridu sodnému.¹⁰

Kontrola kvality

Systém činidel by měl být monitorován pomocí sklíček pro pozitivní a negativní kontrolu. Pozitivní kontrolní sklíčka lze připravit ze specifických buněčných linií, o nichž je známo, že jsou pozitivní.

Alternativně lze také použít antikoagulovanou krev z normálních vzorků (nejlépe se zvýšeným počtem monocytů, pokud se použije postup pro α-naftylacetát esterázu); ty však poskytnou méně intenzivní barvení a budou mít méně pozitivních buněk.

Jako negativní kontrolu lze použít známá negativní sklíčka pacientů. Pokud nejsou k dispozici, poskytnete požadované výsledky obarvení vzorku v inkubační směsi s vynechaným substrátem. Důrazně se však doporučuje použít první možnost.

Pokud se pozorované výsledky liší od očekávaných výsledků, obraťte se na technický servis společnosti Sigma-Aldrich.

Analytické pracovní charakteristiky

Analytické výsledky daných testů provedených na všech cílových strukturách potvrzují 100% citlivost, specifčnost a opakovatelnost.

Kat. č.	Popis produktu	Cíl	Specifičnost v rámci testu	Citlivost v rámci testu	Specifičnost mezi testy	Citlivost mezi testy
911	Roztok naftol AS-D chloracetátu	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
912	Základní roztok Fast Red Violet LB	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
913	Koncentrát TRIZMAL™ 6.3	Osmolalita	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
		pH	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
914	Roztok dusičnanu sodného	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
915	Roztok citrátů	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
916	Roztok α-naftylacetátu	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
917	Základní roztok Fast Blue BB	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
918	Koncentrát TRIZMAL™ 7.6	Osmolalita	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
		pH	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
919	Roztok fluoridu sodného	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
GHS3	Roztok hematoxylinu podle Gilla č. 3	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3

Varování a rizika

Aktuální informace o rizicích, nebezpečích a bezpečnosti si přečtěte v bezpečnostním listu a na označení výrobku.

91A:



- H226 Hořlavá kapalina a páry.
- H290 Může být korozivní pro kovy.
- H301 Toxický při požití.
- H312 + H332 Zdraví škodlivý při styku s kůží nebo při vdechování.
- H319 Způsobuje vážné podráždění očí.
- H370 Způsobuje poškození orgánů (oči, centrální nervový systém).
- H412 Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými účinky.

- P210 Uchovávejte mimo dosah tepla, horkých povrchů, jisker, otevřeného ohně a jiných zdrojů vznícení. Zákaz kouření.
- P273 Zabraňte uvolňování do životního prostředí.
- P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje.
- P301 + P310 PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.
- P303 + P361 + P353 PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Okamžitě si svlékněte všechny kontaminované oděvy. Opláchněte pokožku vodou.
- P304 + P340 + P312 PŘI VDECHNUTÍ: Odvedte postiženého na čerstvý vzduch a zajistěte mu pohodlné dýchání. Pokud se necítíte dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ středisko / lékaře.

91C:



- H290 Může být korozivní pro kovy.
- H302 Zdraví škodlivý při požití.
- H315 Způsobuje podráždění kůže.
- H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.
- H318 Způsobuje vážné poškození očí.
- H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest.
- H360FD Může poškodit plodnost. Může poškodit nenarozené dítě.
- H373 Může způsobit poškození orgánů (ledviny) při dlouhodobé nebo opakované expozici při požití.
- P202 Nemanipulujte, dokud si nepřetčete a neporozumíte všem bezpečnostním opatřením.
- P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje.
- P301 + P312 PŘI POŽITÍ: Pokud se necítíte dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ středisko / lékaře.
- P302 + P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Umyjte velkým množstvím vody.
- P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyjmout. Pokračujte ve vyplachování.
- P308 + P313 Při expozici nebo znepokojení: Vyhledejte lékařskou pomoc.

Pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné nežádoucí příhodě, nahlase to výrobcí a/nebo jeho autorizovanému zástupci a vašemu národnímu úřadu.

Definice symbolů

Symbody definované v normě EN ISO 15223-1:2021

	Výrobce		Katalogové číslo
	Přečtěte si Návod k použití		Kód šarže
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii		Prohlášení o shodě s předpisy Evropské unie (podle definice v IVDR 2017/746)
	Datum spotřeby		Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Teplotní limit		Upozornění
	Datum výroby		Dovozce
	Označuje autorizovaného zástupce ve Švýcarsku		

Reference

1. Beckmann J, Neth R, Gaedlicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Kontaktní informace

Chcete-li podat objednávku, navštivte naše webové stránky na [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Technický servis naleznete na stránkách technického servisu na naší webové stránce [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historie revizí

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Přeneseno do nové šablony s aktuálním značením. Určeno pro profesionální použití v rámci určeného použití a bezpečnostních opatření. Přesunutí nápovědy k určení diagnózy do určeného použití. Revidované určené použití k dosažení souladu s pokyny IVDR. Aktualizovaný bezpečnostní list materiálu k bezpečnostnímu listu. Aktualizované kontaktní informace. Odstraněn pokyn k dodržení CLSI pro odběr vzorků. Odstraněna norma EN 980 a změněna na normu EN ISO 15223-1:2021 pro symboly. Přidány kontaktní informace pro případ nežádoucí události. Aktualizované reference na literaturu. Přidána tabulka historie revizí. Přidána varování a rizika. Přidány informace CH-REP.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Počáteční M a Sigma-Aldrich jsou ochranné známky společnosti Merck KGaA, Darmstadt, Německo nebo jejich přidružených společností. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách jsou k dispozici prostřednictvím veřejně přístupných zdrojů.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Bruksanvisning

Leukocytt α -naftylacetate (ikke-spesifikk esterase)- og leukocytt naftol-AS-Dkloracetat (spesifikk esterase)-sett

Prosedyre nr. 91



Tiltenkt bruk

Sigma-Aldrich naftol-AS-D-kloracetatesterase- og α -naftylacetatesterase-sett er ment å være en generell histologisk fargeløsning for bruk i et laboratorium. Naftol-AS-D-kloracetatesterase- og α -naftylacetatesterase-reagenser er kun for profesjonell "in vitro-diagnostisk bruk". Denne manuelle, kvalitative og histokjemiske prosedyren demonstrerer naftol-AS-D-kloracetatesterase- og α -naftylacetatesterase-aktivitet i leukocyter i menneskeblod, benmargsfilmer eller vevsberøringsavtrykk. Histologisk visualisering av leukocyttcellulære esteraser er en unik teknikk som ofte brukes innen medisin.

Cellulære esteraser finnes overalt og ser ut til å representere en serie ulike enzymer som virker på utvalgte substrater. Under definerte reaksjonsforhold kan det være mulig å fastslå hemopoietiske cellyper ved bruk av spesifikke esterase-substrater. De beskrevne metodene gir hematologer og hematopatologer metoder for å skjelne granulocyter fra monocytter.¹⁻⁷

For å utføre testen inkuberes blod, benmargsfilmer eller vevsberøringsavtrykk med enten naftol-AS-D-kloracetat (NCAE) eller α -naftylacetat (NAE) ved tilstedeværelse av et ferskt dannet diazoniumsalt. Enzymatisk hydrolyse av esterbindinger frigjør frie naftolforbindelser. Disse kobles til diazoniumsalt og danner sterkt fargede avsetninger på stedene med enzymaktivitet.

De fleste nylige prosedyrer, inkludert de fra Sigma-Aldrich, benytter stabile diazoniumsalter. Disse dannes ved å reagere et arylamin med natriumnitritt i et surt medium.⁸ Det resulterende diazoniumkloridet (som regel ustabil) kan deretter behandles med forbindelser som sinkklorid, sinksulfat eller naftalen-1,6-disulfonat, som danner stabile salter. Disse stabiliseringsmidlene kan utøve markert hemming på enkelte enzymsystemer, mens diazoniumkloridene er mindre hemmende.⁸ Av denne grunn tilbyr Sigma-Aldrich nå stabile løsninger for Fast Red Violet LB-base, Fast Blue BB-base og natriumnitritt for esterasecytokjemi. For ytterligere å forenkle disse metodene er stabile løsninger av naftol-AS-D-kloracetat og α -naftylacetat inkludert. Tilgjengeligheten av disse stabile løsningene gjør at kunden kan justere volumene av arbeidsreagens etter behov, noe som eliminerer avfall.

Reagenser

Naftol-AS-D-kloracetatløsning (kat.nr. 911-10ML)

Naftol-AS-D-kloracetat, 8 mg/ml og stabiliseringsmiddel. Advarsel. Gir øyeirritasjon. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

Fast Red Violet LB-baseløsning (kat.nr. 912-10ML)

Fast Red Violet LB-base, 15 mg/ml, i 0,4 mol/l saltsyre med stabiliseringsmiddel. Fare. Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern.

TRIZMAL™ 6.3-konsentrat (kat.nr. 913-50ML)

TRIZMA®-maleat, 1 mol/l, med overflateaktivt middel. pH 6,3 ± 0,15 ved 25 °C. Fare. Irriterer huden. Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Gir alvorlig øyeskade. Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern.

Natriumnitrittløsning (kat.nr. 914-10ML)

Natriumnitritt, 0,1 mol/l.

Sitratløsning (kat.nr. 915-50ML)

Sitronsyre, 18 mmol/l, natriumsitrat, 9 mmol/l, natriumklorid, 12 mmol/l, med overflateaktivt middel. pH 3,6 ± 0,1 ved 25 °C

α -naftylacetatløsning (kat.nr. 916-10ML)

α -naftylacetat, 12,5 mg/ml, i metanoløsning med stabiliseringsmidler. Fare. Brannfarlig væske og damp. Giftig ved svelging. Farlig ved hudkontakt eller innånding. Gir mild hudirritasjon. Gir alvorlig øyeirritasjon. Forårsaker organskader.

Fast Blue BB-baseløsning (kat.nr. 917-10ML)

Fast Blue BB-base, 15 mg/ml, C.I. 37175 i 0,4 mol/l saltsyre med stabiliseringsmidler. Advarsel. Farlig ved svelging. Gir mild hudirritasjon. Gir alvorlig øyeirritasjon. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre.

TRIZMAL™ 7.6-konsentrat (kat.nr. 918-50ML)

TRIZMA®-maleat, 1 mol/l, med overflateaktivt middel. pH 7,6 ± 0,15 ved 25 °C. Fare. Irriterer huden. Gir alvorlig øyeskade. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Kan forårsake irritasjon av luftveiene. Skadelig for liv i vann.

Hematoksylinløsning Gill nr. 3 (kat.nr. GHS3-50ML)

Sertifisert hematoksylin, 6,0 g/l, C.I. 75290, natriumjodat, 0,6 g/l, og aluminiumsulfat, 52,8 g/l, med stabiliseringsmidler. Fare. Farlig ved svelging. Gir alvorlig øyeskade. Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern.

Natriumfluoridløsning (kat.nr. 919-25ML)

Natriumfluorid, 20 g/l. Advarsel. Farlig ved svelging. Gir mild hudirritasjon.

Spesielle materialer som kreves, men som ikke medfølger

- Aceton, ACS-reagens
- Formaldehyd, 37 %, ACS
- Natriumfluoridløsning, kat. nr. 919-25ML (påkrevd for α -naftylacetatesterase med fluoridhemningsprosedyre.)

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar hematoksylinløsning, Gill-nr. 3 i romtemperatur (18–26 °C) beskyttet mot lys. Oppbevar andre reagenser i kjøleskap (2–8 °C).

TRIZMAL™ 6.3-konsentrat, TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat og sitratløsning er egnet for bruk i fravær av mikrobiell vekst. Andre reagenser er stabile frem til utløpsdatoen på etikettene.

Forringelse

Kast TRIZMAL™-konsentrat og sitratløsning hvis mikrobiell vekst er synlig. Kast hematoksylinløsning, Gill-nr. 3 hvis løsningen blir brun (overoksidert fra luft) eller lilla (tap av surhet).

Fremstilling

Varm alle reagenser opp til romtemperatur (18–26 °C) før bruk. Esterasereagenser leveres klare til bruk.

Fikseringsmiddel med sitrat-aceton-formaldehyd: Tilsett 65 ml aceton og 8 ml 37 % formaldehyd i 25 ml sitratløsning. Plasser i en glassflaske og lukk godt igjen. Oppbevares i kjøleskap (2–8 °C). Romtemperer (18–26 °C) før bruk. Stabil i opptil 4 uker ved oppbevaring godt lukket i kjøleskap.

Forsiktighetsregler

IVD-ene inkludert i disse settene er beregnet for in vitro-diagnostisk bruk i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD-ene er kun for profesjonell bruk av kvalifisert personell. Sigma-Aldrich-IVD-er kan betjenes av laboratoriepersonell som er opplært i å håndtere humane prøver som kan være smittsomme, bruke mikroskoper og annet laboratorieutstyr og som har fargeoppfatning og synsskarphet for å skille farger og andre elementer under et mikroskop.

Normale forsiktighetsregler for håndtering av laboratoriereagenser bør følges. Avfall må kastes i samsvar med alle lokale, statlige, provinsielle eller nasjonale forskrifter.

Prosedyre

Prøvetaking

Ingen kjent testmetode kan fullt ut forsikre at blodprøver eller vev ikke utgjør en smittefare. Alle blodderivater eller vevsprøver bør derfor betraktes som potensielt smittefarlige.

Blod, benmargsfilmer, vevsberøringsavtrykk og cytosentrifugepreparater kan brukes med både α -naftylacetatesterase og naftol-AS-D-kloracetatesterase. Enten EDTA eller heparin vil fungere som en antikoagulant.⁹ Frosne og parafininnstøpte vev kan brukes med naftol-AS-D-kloracetatesterase. α -naftylacetatesterase kan brukes med suksess på frosne vevsnitt.¹⁰ Blod- eller benmargsfilmer kan oppbevares fiksert i romtemperatur (18–26 °C) i flere uker eller ufiksert i flere dager uten merkbart endring i aktivitet.^{4,9} Ikke send fullblodet til analysing på andre laboratorier. Send fikserte eller ufikserte objektglass. Objektglass bør oppbevares kjølig under transport. La filmen tørke minst 1 time før fiksering.

Begrensninger i prosedyren

De beskrevne prosedyrene utføres ved 37 °C. Hvis reagensene ikke har denne temperaturen, kan det oppstå svake eller negative reaksjoner. Det anbefales at temperaturen kontrolleres med et nøyaktig termometer. Vannbad med kontrollert temperatur er mer effektivt enn varmluftinkubatorer og bør brukes til enzymcytokjemiske metoder. Varmeoverføring gjennom glass er raskere enn gjennom plast, og derfor bør Coplin-beholdere av glass brukes.

Mange enzymsystemer er følsomme for små spor av vaskemiddel. Vasking av glass med fortynt blekemiddel etterfulgt av skylling i rikelige mengder avionisert vann vil forhindre vaskemiddeleffekt på cellulære enzymer.

Fikseringssystemet som beskrives i avsnittet "Reagenser", inneholder formaldehyd. Hvis fikseringsmidlet ikke fjernes fullstendig med kraftig skylling, kan enhver mengde aldehyd, enten konsentrert på lufttørkede objektglass eller spormengder fra våte objektglass, som tilsettes i inkubasjonssystemet føre til enzymhemming. For å forhindre tap av blodfilm under skylleprosessen må vannstrømmen rettes på objektglasset over "fjærkanten" (den tynne delen) av prøven. Skyll begge sider av objektglasset.

Resultatene er basert på en viss grad av subjektiv tolkning. Individuelle laboratorier bør fastsette sine egne normalområder.

Merknader

Brukere av Sigma-sett 390A og 91C bør utvise forsiktighet ved bruk av TRIZMA®-bufferkonsentrater, katalognr. 913 og 903C, da de ikke kan brukes om hverandre. Bruk av feil buffer vil resultere i en negativ reaksjon.

Prosedyre

De beskrevne prosedyrene utføres ved 37 °C.

Prosedyre for naftol-AS-D-kloracetatesterase

- Forvarm tilstrekkelig avionisert vann for substratbuk til 37 °C. Kontroller temperaturen før bruk.
- Umiddelbart før fiksering tilsetter du 1 ml natriumnitrittløsning i 1 ml Fast Red Violet LB-baseløsning i et testrør. Bland forsiktig ved å snu opp ned og la stå i 2 minutter. Aktiv utvikling av gassbobler bør unngås.
- Tilsett løsning fra trinn 2 i 40 ml forvarmet avionisert vann fra trinn 1.
- Tilsett 5 ml TRIZMAL™ 6.3-bufferkonsentrat (Se "Merk")
- Tilsett 1 ml naftol-AS-D-kloracetatløsning. Løsningen skal bli rød. Bland godt og hell i en Coplin-beholder.
- Romtemperer (18–26 °C) sitrat-aceton-formaldehyd (CAF)-løsningen. Fikser objektglass ved å senke dem ned i CAF-løsning i 30 sekunder.
- Skyll objektglassene grundig i rennende avionisert vann i 45–60 sekunder, og legg dem deretter i løsningen fra trinn 5. Objektglassene skal ikke lufttørkes.
- Inkuber i 15 minutter ved 37 °C beskyttet mot lys.
- Etter 15 minutter, fjern objektglassene og skyll grundig i avionisert vann i minst 2 minutter.
- Kontrastfarg i 2 minutter i hematoksylinløsning, Gill-nr. 3.
- Skyll i vann fra springen og lufttørk.
- Evaluer mikroskopisk. Hvis dekkglass kreves, må du kun bruke et vannholdig monteringsmedium.

Merknader

- For bruk med Columbia-glass deles reagensvolumene med 5.
- Hvis substratet (se trinn 5) virker uklart, skal det romtempereres (18–26 °C) og blandes godt.
- Hvis objektglassene har blitt prefiksert og lagret, hopper du over fikseringen (trinn 6 og 7) og starter med fargingen av tørre, prefikserte objektglass i trinn 8.

Prosedyre for α-naftylacetatesterase

- Forvarm tilstrekkelig avionisert vann for substratbruk til 37 °C. Kontroller temperaturen før bruk.
- Umiddelbart før fiksering tilsetter du 1 ml natriumnitrittløsning i 1 ml Fast Blue BB-baseløsning i et testrør. Bland ved å snu opp ned og la stå i minst 2 minutter. Fargen vil endre seg fra skittenbrun til mørkegul. Aktiv utvikling av gassbobler bør unngås.
- Tilsett løsning fra trinn 2 i 40 ml forvarmet avionisert vann fra trinn 1.
- Tilsett 5 ml TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat.
- Tilsett 1 ml α-naftylacetatløsning. Løsningen skal bli grønnaktig. Bland godt og hell i en Coplin-beholder.
- Romtemperer (18–26 °C) sitrat-aceton-formaldehyd (CAF)-løsningen. Fikser objektglass ved å senke dem ned i CAF-løsning i 30 sekunder. Rist objektglassene kraftig de siste 5 sekundene.
- Skyll objektglassene grundig i rennende avionisert vann i 45–60 sekunder, og legg dem deretter i løsningen fra trinn 5. Objektglassene skal ikke lufttørkes.
- Inkuber i 30 minutter ved 37 °C beskyttet mot lys.
- Etter 30 minutter, fjern objektglassene og skyll dem grundig i minst 2 minutter i rennende avionisert vann.
- Kontrastfarg i 2 minutter i hematoksylinløsning, Gill-nr. 3.
- Skyll i vann fra springen og lufttørk.
- Evaluer mikroskopisk. Hvis dekkglass kreves, må du kun bruke et vannholdig monteringsmedium.

Merknader

- For bruk med Columbia-glass deles reagensvolumene med 5.
- Hvis substratet (se trinn 5) virker uklart, skal det romtempereres (18–26 °C) og blandes godt.
- Hvis objektglassene har blitt prefixsert og lagret, hopper du over fikseringen (trinn 6 og 7) og starter med fargingen av tørre, prefixserte objektglass i trinn 8.

Prosedyre for esterase med dobbel farging

- Utfør α-naftylacetatesterasetesten som beskrevet i prosedyren. Skal ikke kontrastfarges.
- Skyll objektglassene i 5 minutter i avionisert vann.
- Utfør α-naftol-AS-D-kloracetatesterasetesten som beskrevet i prosedyretrinn 1–12. Hopp over trinn 6.

Merk

Fast Blue BB-baseløsning kan erstattes med Fast Red Violet LB-baseløsning hvis blå granulering foretrekkes for naftol-AS-D-kloracetatesterase.

Prosedyre for α-naftylacetatesterase med fluoridhemming

Selv om α-naftylacetatesterase primært finnes i celler av monocytisk cellelinje når de utføres som beskrevet, bør det vedkjennes at megakaryocytter og erytroide forløpere er positive for dette enzymet.¹¹ Lymfocytter og noen modne granulocytter viser også sporadisk positivitet.⁴ For å differensiere disse cellene definitivt fra monocytter er natriumfluorid innlemmet i inkubasjonssystemet. Monocyttenzymet inaktiveres ved tilstedeværelse av denne forbindelsen.¹² Følgende prosedyre kan brukes til å utføre fluoridhemmingstesten.

- Tilsett 2 ml natriumnitrittløsning i 2 ml Fast Blue BB-baseløsning. Bland varsomt ved å snu opp ned. La stå i 2 minutter.
- Merk 2 begre A og B, og tilsett følgende:

	Beger A	Beger B
Forvarmet 37 °C avionisert vann	40 ml	40 ml
Diazotisert Fast Blue BB fra trinn 1	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7.6-konsentrat	5 ml	5 ml
α-naftylacetatløsning	1 ml	1 ml
Natriumfluoridløsning	-	1 ml

- Bland godt og hell i Coplin-beholdere merket A og B.
- Fortsett som beskrevet i trinn 6–12 i prosedyren for α-naftylacetatesterase.

Ytelsesegenskaper

Skåringsmetode

Skann filmen og velg et tynt område med få erytrocytter. Steder med naftol-AS-D-kloracetatesterase-aktivitet vises som knallrød granulering, α-naftylacetatesterase som svart granulering. Gi vurdering fra 0 til 4+ på grunnlag av mengde og intensitet av individuelle fargestoff i cytoplasmaet til de relevante celtypene. Egenskaper ved skåring er noe basert på subjektiv tolkning. Et foreslått skåringsformat er oppført i tabell 1. Konklusjoner fokuserer på relativ tilstedeværelse eller fravær av farging.

Tabell 1. Skåringsegenskaper

Cellevurdering	Fargeintensitet	Tolkning
0+	Ingen	–
1+	Svak til moderat	±
2+	Moderat til sterk	+
3+	Sterk	++
4+	Strålende	+++

Forventede observasjoner

Naftol-AS-D-kloracetatesterase

(Fast Red Violet LB) – enzymet anses som regel å være spesifikt for granulocytiske cellelinjer. Aktivitetssteder viser sterkt rød granulering. Aktivitet er svak eller fraværende i monocytter og lymfocytter.

α-naftylacetatesterase

(Fast Blue BB) – enzymet påvises primært i monocytter, makrofager og histiocytter, og er så godt som fraværende i granulocytter. Monocytter skal vise svart granulering. Lymfocytter kan av og til utvise enzymaktivitet.

Esterase med dobbel farging

Prøver tatt med den doble fargingsprosedyren viser granulocytter med rød granulering og monocytter med svart granulering.

α-naftylacetatesterase med fluoridhemming

Alle celler av monocytisk cellelinje er negative for enzymaktivitet, med unntak av differensierte histiocytter eller spesialiserte makrofager i vev som også kan være resistent mot natriumfluorid.¹⁰

Kvalitetskontroll

Reagenssystemet bør overvåkes ved bruk av positive og negative kontrollobjektglass. Positive kontrollobjektglass kan forberedes fra spesifikke cellelinjer som er kjent for å være positive.

Alternativt kan antikoagulert blod fra normale prøver (helst med økt monocyttall ved bruk av en prosedyre med α-naftylacetatesterase) også brukes, men de gir mindre intens farging og har færre positive celler.

Kjente negative pasientobjektglass kan brukes som en negativ kontroll. Hvis dette ikke er tilgjengelig, kan ønskede resultater oppnås ved å farge en prøve i en inkubasjonsblanding uten substratet. Førstnevnte er imidlertid sterkt anbefalt.

Hvis observerte resultater avviker fra forventede resultater, kontakt teknisk service hos Sigma-Aldrich for å få hjelp.

Analytiske ytelsesegenskaper

De analytiske ytelsesresultatene for de gitte testene utført på alle målstrukturer bekrefter 100 % følsomhet, spesifisitet og repetérbarhet.

Kat. nr.	Produkt-beskrivelse	Mål	Spesifisitet innen analyse	Følsomhet innen analyse	Spesifisitet mellom analyser	Følsomhet mellom analyser
911	Naftol-AS-D-kloracetatløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
912	Fast Red Violet LB-baseløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
913	TRIZMAL™ 6.3-konsentrat	Osmolalitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
		pH	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
914	Nitrittløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
915	Sitratløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
916	α-naftylacetatløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
917	Fast Blue BB-baseløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
918	TRIZMAL™ 7.6-konsentrat	Osmolalitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
		pH	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
919	Natriumfluorid-løsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
GHS3	Hematoksylin-løsning, Gill-nr. 3	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Advarsler og farer

Se sikkerhetsdatablad og produktmerking for oppdatert risiko-, fare- eller sikkerhetsinformasjon.

91A:



H226 Brannfarlig væske og damp.

H290 Kan være etsende for metaller.

H301 Giftig ved svelging.

H312 + H332 Farlig ved hudkontakt eller innånding.

H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.

H370 Forårsaker organskader (øyne, sentralnervesystem).

H412 Skadelig, med langtidsvirkning, for liv i vann.

P210 Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningsskilder. Røyking forbudt.

P273 Unngå utslipp til miljøet.

P280 Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.

P301 + P310 VED SVELGING: Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll huden med vann.

P304 + P340 + P312 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege ved ubehag.

91C:



- H290 Kan være etsende for metaller.
- H302 Farlig ved svelging.
- H315 Irriterer huden.
- H317 Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
- H318 Gir alvorlig øyeskade.
- H335 Kan forårsake irritasjon av luftveiene.
- H360FD Kan skade forplantningsevnen. Kan gi fosterskader.
- H373 Kan forårsake organskader (nyrer) ved langvarig eller gjentatt eksponering.
- P202 Skal ikke håndteres før alle advarsler er lest og oppfattet.
- P280 Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.
- P301 + P312 VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege ved ubehag.
- P302 + P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.
- P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.
- P308 + P313 Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.

Hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av denne enheten eller som et resultat av bruken, rapporter det til produsenten og/eller produsentens autoriserte representant og til din nasjonale myndighet.

Symbolforklaring

Symboler som definert i EN ISO 15223-1:2021

	Produsent		Katalognummer
	Se bruksanvisning		Batchkode
	Autorisert representant i Det europeiske fellesskap / EU		EU-samsvarserklæring (definert i IVDR 2017/746)
	Best før-dato		In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr
	Temperaturgrense		Forsiktighetsregel
	Produksjonsdato		Importør
	Angir autorisert representant i Sveits		

Referanser

- Beckmann J, Neth R, Gaeddicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
- Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
- Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Kontaktinformasjon

For å legge inn en bestilling, besøk nettstedet vårt på [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Besøk siden for teknisk service på nettstedet vårt på [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice) for teknisk service.

Revisjonshistorikk

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Overførte til ny mal med gjeldende varemerke. Spesifiserte at utstyret er for profesjonell bruk, i tiltenkt bruk og forsiktighetsregler. Reviderte tiltenkt bruk for å overholde IVDR-retningslinjer. Oppdaterte materialsikkerhetsdatablad til sikkerhetsdatablad. Oppdaterte kontaktinformasjon. Fjernet instruksjon om å følge CLSI for prøvetaking. Fjernet EN 980 og endret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. La til kontaktinformasjon for bivirkninger. Oppdaterte litteraturreferanser. La til en tabell med revisjonshistorikk. La til advarsler og farer. La til informasjon om CH-REP.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initialen M og Sigma-Aldrich er varemerker for Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dets tilknyttede selskaper. Alle andre varemerker tilhører sine respektive eiere. Detaljert informasjon om varemerker er tilgjengelig via offentlig tilgjengelige ressurser.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Kullanma Talimatı

Lökosit α-Naftil Asetat (Spesifik Olmayan Esteraz) ve Lökosit Naftol AS-D Kloroasetat (Spesifik Esteraz) Kiti

Prosedür No. 91



Kullanım Amacı

Sigma-Aldrich Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz ve α-Naftil Asetat Esteraz kitleri genel laboratuvar kullanımı için histolojik boya olarak tasarlanmıştır. Naftol AS-D kloroasetat esteraz ve α-naftil asetat esteraz reaktifleri yalnızca profesyonel "In Vitro Tanı Amaçlı Kullanım" içindir. Bu manuel, kalitatif, histokimyasal prosedür, insan kanı, kemik iliği veya doku dokundurma preparatlarının lökositlerinde, naftol AS-D kloroasetat esteraz ve α-naftil asetat esteraz aktivitesini gösterir. Lökosit hücresel esterazlarının histolojik olarak görselleştirilmesi, şu anda tipta yaygın olarak kullanılan benzersiz bir tekniktir.

Hücresel esterazlar yaygın olarak bulunmakta ve seçilmiş substratlar üzerinde etkili olan bir dizi farklı enzim temsil ediyor gibi görünmektedir. Tanımlanmış reaksiyon koşulları altında, spesifik esteraz substratları kullanılarak hemopoietik hücre tiplerinin belirlenmesi mümkün olabilir. Açıklanan yöntemler, hematologlar ve hematopatologların granülositleri monositlerden ayırt etmesi için araçlar sağlar.¹⁻⁷

Testi gerçekleştirmek için kan, kemik iliği filmleri veya doku dokundurma preparatları, yeni oluşmuş bir diazonyum tuzunun varlığında naftol AS-D kloroasetat (NCAE) veya α-naftil (NAE) asetat ile inkübe edilir. Ester bağlantılarının enzimatik hidrolizi, serbest naftol bileşiklerini serbest bırakır. Bunlar, diazonyum tuzu ile birleşerek enzim aktivitesi bölgelerinde oldukça renkli birikintiler oluşturur.

Sigma-Aldrich tarafından sağlananlar da dahil olmak üzere çoğu güncel prosedürde stabil diazonyum tuzları kullanılır. Bunlar, bir asit ortamında arilamin ile sodyum nitritin reaksiyona sokulmasıyla oluşturulur.⁸ Ortaya çıkan diazonyum klorür (genellikle instabil), daha sonra stabil tuzlar oluşturan çinko klorür, çinko sülfat veya naftalin-1-6-disülfonat gibi bileşiklerle işlenebilir. Bu stabilizatörler bazı enzimatik sistemler üzerinde belirlenmiş inhibisyon uygulayabilirken, diazonyum klorürler daha az inhibitördür.⁹ Bu nedenle, Sigma-Aldrich artık esteraz sitokimyası için Hızlı Kırmızı Mor LB Baz, Hızlı Mavi BB Baz ve Sodyum Nitrat için stabil çözeltiler sağlamaktadır. Bu yöntemleri daha da basitleştirmek için Naftol AS-D Kloroasetat ve α-Naftil Asetatın stabil çözeltileri dahil edilmiştir. Bu stabil çözeltilerin mevcudiyeti, müşterinin çalışma reaktifi ölçülerini ihtiyaca göre ayarlayarak ısrarı ortadan kaldırmasına olanak tanır.

Reaktifler

Naftol AS-D Kloroasetat Çözeltisi (Kat. No. 911-10ML)

Naftol AS-D kloroasetat, 8 mg/mL ve stabilizatör. Uyarı: Göz tahrişine neden olur. GÖZLE TEMASI DURUMUNDA: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

Hızlı Kırmızı Mor LB Baz Çözeltisi (Kat. No. 912-10ML)

Hızlı kırmızı viyole LB baz, 15 mg/mL, 0,4 mol/L hidroklorik asit içinde stabilizatör ile. Tehlike. Ciddi cilt yanıklarna ve göz hasarına neden olur. Korumucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

TRIZMAL™ 6.3 Konsantresi (Kat. No. 913-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/L, sürfaktan ile. 25°C'de pH 6,3 ± 0,15. Tehlike. Cilt tahrişine neden olur. Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. Ciddi göz hasarına neden olur. Korumucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

Sodyum Nitrit Çözeltisi (Kat. No. 914-10ML)

Sodyum nitrit, 0,1 mol/L

Sitrat Çözeltisi (Kat. No. 915-50ML)

Sitrik asit, 18 mmol/L, sodyum sitrat, 9 mmol/L, sodyum klorür, 12 mmol/L, sürfaktan ile, 25°C'de pH 3,6 ± 0,1.

α-Naftil Asetat Çözeltisi (Kat. No. 916-10ML)

α-Naftil asetat, 12,5 mg/mL, metanol çözeltisi içinde stabilizatörler ile. Tehlike. Alevlenir sıvı ve buhar. Yutulması halinde zehirlidir. Cilt ile teması veya solunması halinde zararlıdır. Hafif cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz tahrişine neden olur. Organlarda hasara neden olur.

Hızlı Mavi BB Baz Çözeltisi (Kat. No. 917-10ML)

Hızlı mavi BB baz, 15 mg/mL, C.I. 37175, 0,4 mol/L hidroklorik asit içinde stabilizatörler ile. Uyarı. Yutulması halinde zararlıdır. Hafif cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz tahrişine neden olur. GÖZLE TEMASI DURUMUNDA: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın.

TRIZMAL™ 7.6 Konsantresi (Kat. No. 918-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/L, sürfaktan ile. 25°C'de pH 7,6 ± 0,15. Tehlike. Cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz hasarına neden olur. Solunması halinde alerji veya astım semptomlarına ya da solunum güçlüğüne neden olabilir. Solunum tahrişine neden olabilir. Sudaki yaşam için zararlıdır.

Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3 (Kat. No. GHS3-50ML)

Sertifikalı Hematoksilen, 6,0 g/L, C.I. 75290, sodyum iyodat, 0,6 g/L ve alüminyum sülfat, 52,8 g/L, stabilizatörler ile. Tehlike. Yutulması halinde zararlıdır. Ciddi göz hasarına neden olur. Korumucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

Sodyum Florür Çözeltisi (Kat. No. 919-25ML)

Sodyum florür, 20 g/L. Uyarı. Yutulması halinde zararlıdır. Hafif cilt tahrişine neden olur.

Sağlanmayan Gerekli Özel Malzemeler

- Aseton, ACS Reaktif
- Formaldehit, %37, ACS
- Sodyum Florür Çözeltisi, Kat. 919-25ML (Florid İnhibisyonu ile α-Naftil Asetat Esteraz Prosedürü için gereklidir).

Saklama ve Stabilite

Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3'ü oda sıcaklığında (18–26°C) ışıktan koruyarak saklayın. Diğer reaktifleri buzdolabında saklayın (2–8°C).

TRIZMAL™ 6.3 Konsantre, TRIZMAL™ 7.6 Konsantre ve Sitrat Çözeltisi, mikrobiyal büyümenin olmadığı durumlarda kullanıma uygundur. Diğer reaktifler, etikette gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

Bozulma

Mikrobiyal üreme görülürse TRIZMAL™ Konsantre ve Sitrat Çözeltisini atın. Çözelti kahverengiye dönerse (havadan aşırı oksitlenme) veya mora dönerse (asidite kaybı) Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3'ü atın.

Hazırlama

Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına (18–26°C) getirin. Esteraz reaktifleri kullanıma hazır olarak sağlanır.

Sitrat-Aseton-Formaldehit Fiksafisi: 25 mL Sitrat Çözeltisine 65 mL Aseton ve 8 mL %37 Formaldehit ekleyin. Cam şişeye koyun ve ağzını sıkıca kapatın. Buzdolabında saklayın (2–8°C). Kullanmadan önce oda sıcaklığına (18–26°C) getirin. Ağzı sıkıca kapalı olarak buzdolabında saklınırsa 4 haftaya kadar stabildir.

Önlemler

Bu kitlerde bulunan IVD'ler, klinik laboratuvar ortamında in vitro tanı amaçlı kullanıma yöneliktir. Bu IVD'ler yalnızca kalifiye personel tarafından profesyonel kullanım içindir. Sigma-Aldrich IVD'ler, bulaşıcı olabilen insan numunelerini işlemek, mikroskop ve diğer laboratuvar ekipmanlarını kullanmak üzere eğitilmiş, renkleri ve mikroskop altında diğer nesneleri ayırt etmek için renk algısına ve görme keskinliğine sahip laboratuvar personeli tarafından kullanılabilir.

Laboratuvar reaktiflerini kullanırken uygulanan normal önlemlere uyulmalıdır. Atıkları tüm yerel, eyalet, il veya ulusal seviyedeki yönetmeliklere uygun olarak atın.

Prosedür

Numune Toplama

Bilinen hiçbir test yöntemi, kan numunelerinin veya dokunun enfeksiyon bulaştırmayacağını tam olarak garanti edemez. Bu nedenle, tüm kan türevleri veya doku numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı kabul edilmelidir.

Kan, kemik iliği filmleri, doku dokundurma preparatları ve hücre santrifüj preparatları, hem α-naftil asetat esteraz hem de naftol AS-D kloroasetat esteraz ile kullanılabilir. EDTA veya heparin, antikoagulan görevi görcektir.⁹ Dondurulmuş ve parafine gömülü dokular, naftol AS-D kloroasetat esteraz ile kullanılabilir. α-Naftil asetat esteraz, donmuş doku kesitlerinde başarıyla kullanılabilir.¹⁰ Kan veya kemik iliği filmleri aktivitede kayda değer bir değişiklik olmaksızın oda sıcaklığında (18–26°C) fiksasyon uygulanmış olarak birkaç hafta veya fiksasyon uygulanmamış olarak birkaç gün saklanabilir.^{4,9} Diğer laboratuvarlarda tahlil için tam kanı göndermeyin. Fiksasyonlu ve fiksasyonsuz lamları gönderin. Taşıma sırasında lamlar soğuk kalmalıdır. Fiksasyondan en az 1 saat önce filmlerin kurumasını bekleyin.

Prosedüre İlişkin Sınırlamalar

Açıklanan prosedürler 37°C'de gerçekleştirilir. Reaktifler bu sıcaklıkta değilse zayıf veya negatif reaksiyonlar elde edilebilir. Sıcaklıkların doğru bir termometre ile kontrol edilmesi önerilir. Kontrollü sıcaklıktaki su banyoları, sıcak hava inkübatörlerinden daha etkilidir ve enzim sitokimyasal yöntemleri için kullanılmalıdır. Camdan ısı transferi plastikten daha hızlıdır, bu nedenle cam Coplin kavanozları kullanılmalıdır.

Birçok enzim sistemi, çok küçük deterjan kalıntılarına karşı hassastır. Cam eşyaların seyreltik ağartıcı ile yıkanması ve ardından bol miktarda deiyonize su ile durulanması, hücrel enzimler üzerindeki deterjan etkisini önleyecektir.

"Reaktifler" bölümünde açıklanan fiksatif sistem formaldehit içerir. Fiksatif kuvvetli durulama ile tamamen çıkarılmazsa, inkübasyon sistemine eklenen herhangi bir miktarda aldehit (kurumaya bırakılmış lamlar üzerinde konsantre olarak veya ıslak lamlardan eser miktarda), enzim inhibisyonuna neden olabilir. Durulama işlemi sırasında kan filmi kaybını önlemek için, su akışını tüy kenarının üzerindeki lam üzerine yönlendirin. Lamin her iki tarafını da durulayın.

Sonuçlar, belirli bir dereceye kadar subjektif yorumlamaya dayanmaktadır. Her laboratuvar kendi normal aralıklarını oluşturmalıdır.

Notlar

Sigma Kitleri 390A ve 91C kullanıcıları, TRIZMA® Tampon Konsantreleri Katalog No. 913 ve 903C'yi kullanırken dikkatli olmalıdır çünkü bunlar birbirini yerine kullanılamaz. Yanlış tamponun kullanılması negatif bir reaksiyona neden olur.

Prosedür

Açıklanan prosedürler 37°C'de gerçekleştirilir.

Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz Prosedürü

- Substrat kullanımı için yeterli deiyonize suyu 37°C'ye önceden ısıtın. Kullanmadan önce sıcaklığı doğrulayın.
- Fiksasyondan hemen önce, 1 mL Hızlı Kırmızı Mor LB Baz Çözeltisine 1 mL Sodyum Nitrit Çözeltisi ekleyin. Yavaşça ters yönde karıştırın ve 2 dakika bekletin. Gaz kabarcıklarının aktif olugundan kaçınılmalıdır.
- Adım 2'deki çözeltiyi, Adım 1'deki önceden ısıtılmış 40 mL deiyonize suya ekleyin.
- 5 mL TRIZMAL™ 6.3 Tampon Konsantresi ekleyin. (Bkz. "Not").
- 1 mL Naftol AS-D Kloroasetat Çözeltisi ekleyin. Çözelti kırmızıya dönmelidir. İyice karıştırın ve Coplin kavanozuna dökün.
- Sitrat-Aseton-Formaldehit (CAF) Çözeltisini oda sıcaklığına (18–26°C) getirin. CAF çözeltisine daldırarak lamlara 30 saniye fiksasyon uygulayın.
- Slaytları akan deiyonize suda 45–60 saniye iyice durulayın, ardından Adım 5'teki çözeltiyi yerleştirin. Lamların kurumasına izin vermeyin.
- Işıktan koruyarak 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
- 15 dakika sonra lamları çıkarın ve en az 2 dakika deiyonize suda iyice durulayın.
- Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3 içinde 2 dakika zıt boyama yapın.
- Musluk suyuyla durulayın ve kurumaya bırakın.
- Mikroskopik olarak değerlendirin. Lamel gerekiyorsa, yalnızca sulu bir yerleştirme ortamı kullanın.

Notlar

- Columbia kavanozlarıyla kullanmak için reaktif ölçülerini 5'e bölün.
- Substrat (Bkz. Adım 5) bulanık görünüyorsa, oda sıcaklığına (18–26°C) getirin ve iyice karıştırın.
- Lamlara önceden fiksasyon uygulanmışsa ve böyle saklanmışsa, fiksasyonu (Adım 6 ve 7) atlayın ve kuru, fiksasyon uygulanmış lamları boyamaya Adım 8'de başlayın.

α-Naftil Asetat Esteraz Prosedürü

- Substrat kullanımı için yeterli deiyonize suyu 37°C'ye önceden ısıtın. Kullanmadan önce sıcaklığı doğrulayın.
- Fiksasyondan hemen önce, 1 mL Hızlı Mavi BB Baz Çözeltisine 1 mL Sodyum Nitrit Çözeltisi ekleyin. Ters çevirerek karıştırın ve en az 2 dakika beklemeye bırakın. Renk kirli kahverengiden koyu sarıya değişecektir. Gaz kabarcıklarının aktif oluşumundan kaçınılmalıdır.
- Adım 2'deki çözeltiyi, Adım 1'deki önceden ısıtılmış 40 mL deiyonize suya ekleyin.
- 5 mL TRIZMAL™ 7.6 Tampon Konsantresi ekleyin.
- 1 mL α-Naftil Asetat Çözeltisi ekleyin. Çözelti yeşile dönmelidir. İyice karıştırın ve Coplin kavanozuna dökün.
- Sitrat-Aseton-Formaldehit (CAF) Çözeltisini oda sıcaklığına (18–26°C) getirin. CAF çözeltisine daldırarak lamlara 30 saniye fiksasyonu uygulayın. Lamları son 5 saniye kuvvetlice çalkalayın.
- Slaytları akan deiyonize suda 45–60 saniye iyice durulayın, ardından Adım 5'teki çözeltiye yerleştirin. Lamların kurumasına izin vermeyin.
- Işıktan koruyarak 37°C'de 30 dakika inkübe edin.
- 30 dakika sonunda lamları çıkarın ve akan deiyonize suda en az 2 dakika iyice durulayın.
- Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3 içinde 2 dakika zıt boyama yapın.
- Musluk suyunda durulayın ve kurumaya bırakın.
- Mikroskopik olarak değerlendirin. Lamel gerekiyorsa, yalnızca sulu bir yerleştirme ortamı kullanın.

Notlar

- Columbia kavanozlarıyla kullanmak için reaktif ölçülerini 5'e bölün.
- Substrat (Bkz. Adım 5) bulanık görünüyorsa, oda sıcaklığına (18–26°C) getirin ve iyice karıştırın.
- Lamlara önceden fiksasyon uygulanmışsa ve böyle saklanmışsa, fiksasyonu (Adım 6 ve 7) atlayın ve kuru, fiksasyon uygulanmış lamları boyamaya Adım 8'de başlayın.

Çift Boyama Esteraz Prosedürü

- α-Naftil Asetat Esteraz testini Prosedür bölümünde açıklandığı gibi gerçekleştirin. Zıt boyama yapmayın.
- Lamı deiyonize suda 5 dakika durulayın.
- Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz testini prosedür Adımları 1–12'de açıklandığı gibi gerçekleştirin. Adım 6'yı atlayın.

Not

Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz için mavi granülasyon tercih edilirse, Hızlı Kırmızı Mor LB Baz Çözeltisi Hızlı Mavi BB Baz Çözeltisi yerine kullanılabilir.

Flörür İnhibisyonu ile α-Naftil Asetat Esteraz Prosedürü

α-Naftil asetat esteraz, açıklandığı gibi gerçekleştirildiğinde temel olarak monositik soy hücrelerinde bulunmasına rağmen, megakaryositler ve eritroid öncüllerinin bu enzim için pozitif olduğu kabul edilmektedir.¹¹ Lenfositler ve bazı olgun granülositler de ara sıra pozitiflik gösterir.⁴ Bu hücreleri kesin olarak monositlerden ayırt etmek için inkübasyon sistemine sodyum flörür eklenir. Monosit enzimi, bu bileşiğin varlığında inaktive edilir.¹² Flörür inhibisyon testini gerçekleştirmek için aşağıdaki prosedür kullanılabilir.

- 2 mL Hızlı Mavi BB Baz Çözeltisine 2 mL Sodyum Nitrit Çözeltisi ekleyin. Hafifçe ters çevirerek karıştırın. 2 dakika beklemeye bırakın.
- 2 adet beheri A ve B olarak etiketleyin ve aşağıdakileri ekleyin:

	Behar A	Behar B
Önceden 37°C'ye ısıtılmış deiyonize su	40 mL	40 mL
Adım 1'deki Diazotize Hızlı Mavi BB	2 mL	2 mL
TRIZMAL™ 7.6 Konsantresi	5 mL	5 mL
α-Naftil Asetat Çözeltisi	1 mL	1 mL
Sodyum Flörür Çözeltisi	-	1 mL

- İyice karıştırın ve A ve B etiketli Coplin kavanozlarına dökün.
- α-Naftil Asetat Esteraz Prosedürü Adımları 6–12'de açıklandığı gibi devam edin.

Performans Özellikleri

Skorlama Yöntemi

Filmi tarayın ve birkaç eritrosit içeren ince bir alan seçin. Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz aktivitesi bölgeleri parlak kırmızı granülasyon olarak, α-Naftil Asetat Esteraz ise siyah granülasyon olarak görünecektir. İlgili hücre tiplerinin sitoplazması içindeki tek tek boyaların miktarına ve yoğunluğuna göre 0 ila 4+ arasında skor verin. Skorlama özellikleri kısmen subjektif yorumlamaya dayanmaktadır. Önerilen skorlama formatı Tablo 1'de sunulmuştur. Sonuçlar, boyanmanın göreceli varlığı veya yokluğuna odaklıdır.

Tablo 1. Skorlama Özellikleri

Hücre Derecelendirmesi	Boyama Yoğunluğu	Yorum
0+	Yok	–
1+	Silik ila Orta	±
2+	Orta ila Güçlü	+
3+	Güçlü	+
4+	Parlak	+

Beklenen Gözlemler

Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz

(Hızlı Kırmızı Mor LB) - Enzimin genellikle granülositik soydan gelen hücreler için spesifik olduğu kabul edilir. Aktivite bölgeleri parlak kırmızı granülasyon gösterir. Monositler ve lenfositlerde aktivite zayıf veya yoktur.

α-Naftil Asetat Esteraz

(Hızlı Mavi LB) - Enzim başlıca monositlerde, makrofajlarda ve histiyositlerde saptanır ve granülositlerde hemen hemen yoktur. Monositler siyah granülasyon göstermelidir. Lenfositler bazen enzim aktivitesi gösterebilir.

Çift Boyama Esteraz

Çift boyama prosedürüyle alınan numuneler, kırmızı granülasyonlu granülositleri ve siyah granülasyonlu monositleri gösterecektir.

Flörür İnhibisyonu ile α-Naftil Asetat Esteraz

Sodyum floride dirençli olabilen dokudaki farklılaşmış histiyositler veya özelleşmiş makrofajlar dışında, monositik soydan gelen tüm hücreler enzim aktivitesi açısından negatif olacaktır.¹⁰

Kalite Kontrol

Reaktif sistemi, pozitif ve negatif kontrol lamları kullanılarak izlenmelidir.

Pozitif kontrol lamları, pozitif olduğu bilinen spesifik hücre hatlarından hazırlanabilir.

Alternatif olarak, normal numunelerden (tercihen α-naftil asetat esteraz prosedürü kullanılıyorsa artan monosit sayısı) antikoagüle edilmiş kan da kullanılabilir; ancak bunlar daha az yoğun boyamaya sebep olacak ve daha az pozitif hücreye sahip olacaktır.

Bilinen negatif hasta lamları negatif kontrol olarak kullanılabilir. Mevcut değilse, bir numunenin substrat çıkarılarak inkübasyon karışımında boyanması istenen sonuçları verecektir. Ancak, ilkinin kullanılması şiddetle tavsiye edilir.

Gözlemlenen sonuçlar beklenen sonuçlardan farklıysa, yardım için lütfen Sigma-Aldrich Teknik Servisi ile iletişime geçin.

Analitik Performans Özellikleri

Tüm hedef yapılar üzerinde yürütülen belirli testlere ait analitik performans sonuçları %100 duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliği doğrulamaktadır.

Kat. No.	Ürün Tanımı	Hedef	Tahlil İçi Özgüllük	Tahlil İçi Duyarlılık	Tahliller Arası Özgüllük	Tahliller Arası Duyarlılık
911	Naftol AS-D Kloroasetat Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
912	Hızlı Kırmızı Mor LB Baz Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
913	TRIZMAL™ 6.3 Konsantresi	Osmolalite	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
		pH	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
914	Nitrat Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
915	Sitrat Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
916	α-Naftil Asetat Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
917	Hızlı Mavi BB Baz Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
918	TRIZMAL™ 7.6 Konsantresi	Osmolalite	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
		pH	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
919	Sodyum Flörür Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
GHS3	Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3

Uyarılar ve Tehlikeler

Güncellenmiş herhangi bir risk, tehlike veya güvenlik bilgisi için Güvenlik Veri Formuna ve ürün etiketine bakın.

91A:



H226 Alevlenir sıvı ve buhar.

H290 Metaller için aşındırıcı olabilir.

H301 Yutulması halinde zehirlidir.

H312 + H332 Cilt ile teması veya solunması halinde zararlıdır.

H319 Ciddi göz tahrişine neden olur.

H370 Organlara (gözler, merkezi sinir sistemine) zarar verir.

H412 Sudaki yaşam için uzun süreli etkiyle zararlıdır.

P210 Isıdan, sıcak yüzeylerden, kıvılcımlardan, açık alevlerden ve diğer tutuşturma kaynaklarından uzak tutun. Sigara içmeyin.

P273 Çevreye salınmasını önleyin.

P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P301 + P310 YUTULMASI HALİNDE: Derhal bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P303 + P361 + P353 CİLTLE (veya saçla) TEMASI halinde: Tüm kontamine giysilerinizi hemen çıkarın. Cildinizi suyla durulayın.

P304 + P340 + P312 SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahatça nefes alabileceği bir durumda tutun. Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

91C:



H290 Metaller için aşındırıcı olabilir.

H302 Yutulması halinde zararlıdır.

H315 Cilt tahrişine neden olur.

H317 Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir.

H318 Ciddi göz hasarına neden olur.

H335 Solunum tahrişine neden olabilir.

H360FD Üremeye zarar verebilir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.

H373 Yutulması halinde uzun süreli veya tekrarlı maruziyet sonucu organlarda (böbrek) hasara neden olabilir.

P202 Tüm güvenlik önlemleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.

P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P301 + P312 YUTULMASI HALİNDE: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P302 + P352 ÇİLTLE TEMASI HALİNDE: Bol suyla yıkayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

P308 + P313 Maruz kalınması veya endişe edilen bir durum olması HALİNDE: Tıbbi tavsiye/ müdahale alın.

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımı sonucunda ciddi bir olay meydana gelirse, lütfen bunu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makamınıza bildirin.

Sembol Tanımları

EN ISO 15223-1:2021'de tanımlanan semboller

	Üretici		Katalog Numarası
	Kullanma Talimatına bakın		Parti Kodu
	Avrupa Topluluğu'nda/Avrupa Birliği'nde Yetkili Temsilci		Avrupa Birliği Uygunluk Beyanı (IVDR 2017/746'da tanımlanmıştır)
	Son Kullanma Tarihi		İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Sıcaklık Sınırı		Dikkat
	Üretim Tarihi		İthalatçı
	İsviçre'deki Yetkili Temsilciyi Belirtir		

Referanslar

- Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
- Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
- Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naftol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

İletişim Bilgileri

Sipariş vermek için lütfen SigmaAldrich.com adresinden web sitemizi ziyaret edin. Teknik Servis için lütfen SigmaAldrich.com/techservice adresinden web sitemizin teknik servis sayfasını ziyaret edin.

Revizyon Geçmişi

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Mevcut markalama ile yeni şablona aktarıldı. Kullanım amacı ve önlemler bölümünde profesyonel kullanım amaçlı olduğu belirtildi. Kullanım amacı, IVDR yönergelerine uyumlu şekilde revize edildi. Malzeme Güvenlik Bilgi Formu, Güvenlik Bilgi Formu olarak güncellendi. İletişim bilgileri güncellendi. Numune toplama için CLSI'yi takip etme talimatı kaldırıldı. Semboller için EN 980 kaldırıldı ve EN ISO 15223-1:2021 olarak değiştirildi. Advers olay iletişim bilgileri eklendi. Literatür referansları güncellendi. Bir revizyon geçmişi tablosu eklendi. Uyarılar ve Tehlikeler eklendi. İsviçre'deki yetkili temsilci bilgileri eklendi.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M ve Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Almanya veya bağlı kuruluşlarının ticari markalarıdır. Diğer tüm ticari markalar ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir. Ticari markalar hakkında ayrıntılı bilgi, herkesin erişebileceği kaynaklar aracılığıyla edinilebilir.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Käyttöohje

α-naftyyliasetaatti (epäspesifinen esteraasi)- ja naftoli-AS-D-klooriasetaatti (spesifinen esteraasi) -pakkaus leukosyyteille

Menetelmänro 91



Käyttötarkoitus

Sigma-Aldrichin naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasi- ja α-naftyyliasetaattiesteraasipakkaukset on tarkoitettu histologiseen värjäykseen yleisessä laboratoriotkäytössä. Naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasi- ja α-naftyyliasetaattiesteraasireagenssit on tarkoitettu vain ammattikäyttöön ”in vitro -diagnostiikassa”. Tämä manuaalinen, kvalitatiivinen, histokemiallinen menetelmä osoittaa naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasi- ja α-naftyyliasetaattiesteraasitoiminnan ihmisen veren tai luuytimen sivelyvalmisteiden tai kudoskosketusvalmisteiden leukosyyteissä. Leukosyyttiesteraasin histologinen visualisointi on ainutlaatuinen tekniikka, joka on nykylääketeieteessä yleisessä käytössä.

Solujen esteraaseja on läsnä kaikkialla, ja ne edustavat eri entsyymejä, jotka vaikuttavat tiettyihin substraatteihin. Tarkoin määrätyissä reaktio-olosuhteissa on mahdollista määrittää hemopoeettisia solutyyppejä spesifisten esteraasisubstraattien avulla. Kuvatut menetelmät tarjoavat hematologeille ja hematopatologeille tavan erottaa granulosyyttejä monosyyteistä.¹⁻⁷

Testin suorittamiseksi veri, luutimen sivelyvalmisteet tai kudoskosketusvalmisteet inkuboidaan joko naftoli-AS-D-klooriasetaattiin (NCAE) tai α-naftyyliasetaattiin (NAE), jossa on vasta valmistettua diatoniumsuolaa. Esterisidosten entsymaattinen hydrolyysi vapauttaa vapaita naftolyhdisteitä. Ne sidostuvat diatoniumsuolan kanssa ja muodostavat voimakkaan värisiä kertymiä alueille, joissa on entsyymitoimintaa.

Useimmissa viimeaikaisissa menetelmissä, Sigma-Aldrichin menetelmät mukaan lukien, käytetään stabiileja diatoniumsuoloja. Niitä muodostetaan aryyliamiinin ja natriumnitriitin välisellä reaktiolla happovalaineissa.⁸ Muodostunut (yleensä epästabiili) diatoniumkloridi voidaan tämän jälkeen käsitellä stabiileja suoloja muodostavilla yhdisteillä, kuten sinkkikloridilla, sinkkisulfaatilla tai naftaleeni-1-6-disulfonaatilla. Nämä stabilointiaineet voivat aiheuttaa huomattavaa inhibitiota joihinkin entsyymijärjestelmiin, kun taas diatoniumkloridit eivät ole yhtä inhiboivia.⁸ Tästä syystä Sigma-Aldrich toimittaa nyt stabiiliin nopean puna-violetti-LB-pohjaliuoksen, nopean sini-BB-pohjaliuoksen ja natriumnitriittiliuoksen esteraasisolukemiaa varten. Menetelmien yksinkertaistamiseksi pakkaukset sisältävät myös stabiilit naftoli-AS-D-klooriasetaatti- ja α-naftyyliasetaattiliuokset. Stabiilien liuosten saatavuus auttaa asiakkaita säätämään työskentelyreagenssin määrää tarpeen mukaan ja vähentämään hävikkiä.

Reagenssit

Naftoli-AS-D-klooriasetaattiliuos (luettelonro 911-10ML)
Naftoli-AS-D-klooriasetaatti, 8 mg/ml, ja stabilointiaine. Varoitus. Ärsyttää silmiä. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

Nopea puna-violetti-LB-pohjaliuos (luettelonro 912-10ML)
Nopea puna-violetti-LB-pohja, 15 mg/ml, stabilointiainetta sisältävässä suolahapossa, jonka pitoisuus on 0,4 mol/l. Vaara. Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

TRIZMAL™ 6.3 -konsentraatti (luettelonro 913-50ML)
TRIZMA®-maleaatti, 1 mol/l, ja pinta-aktiivinen aine. pH 6,3 ±0,15 lämpötilan ollessa 25 °C. Vaara. Ärsyttää ihoa. Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa. Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

Natriumnitriittiliuos (luettelonro 914-10ML)
Natriumnitriitti, 0,1 mol/l

Sitraattiliuos (luettelonro 915-50ML)
Sitraunahappo, 18 mmol/l, natriumsitraatti, 9 mmol/l, natriumkloridi, 12 mmol/l, ja pinta-aktiivinen aine, pH 3,6 ±0,1 lämpötilan ollessa 25 °C

α-naftyyliasetaattiliuos (luettelonro 916-10ML)
α-naftyyliasetaatti, 12,5 mg/ml, stabilointiaineita sisältävässä metanoliliuoksessa. Vaara. Syttävä neste ja höyry. Myrkyllistä nieltynä. Haitallista joutuessaan iholle tai hengitettynä. Ärsyttää lievästi ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. Vahingoittaa elimiä.

Nopea sini-BB-pohjaliuos (luettelonro 917-10ML)
Nopea sini-BB-pohja, 15 mg/ml, väri-indeksi 37175, stabilointiaineita sisältävässä suolahapossa, jonka pitoisuus on 0,4 mol/l. Varoitus. Haitallista nieltynä. Ärsyttää lievästi ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti.

TRIZMAL™ 7.6 -konsentraatti (luettelonro 918-50ML)
TRIZMA®-maleaatti, 1 mol/l, ja pinta-aktiivinen aine. pH 7,6 ±0,15 lämpötilan ollessa 25 °C. Vaara. Ärsyttää ihoa. Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Haitallista vesilioelle.

Hematoksyliiniliuos, Gillin nro 3 (luettelonro GHS3-50ML)
Sertifioitu hematoksyliini, 6,0 g/l, väri-indeksi 75290, natriumjodaatti, 0,6 g/l, alumiinisulfaatti, 52,8 g/l, ja stabilointiaineet. Vaara. Haitallista nieltynä. Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa. Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

Natriumfluoridiliuos (luettelonro 919-25ML)
Natriumfluoridi, 20 g/dl. Varoitus. Haitallista nieltynä. Ärsyttää lievästi ihoa.

Tarvittavat erityismateriaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

- Asetoni, ACS-reagenssi
- Formaldehydi, 37 %, ACS
- Natriumfluoridiliuos, luettelonro 919-25ML (tarvitaan α-naftyyliasetaattiesteraasiin fluoridi-inhibitiomenetelmällä)

Säilytys ja stabiilius

Säilytä hematoksyliiniliuos, Gillin nro 3, huoneenlämmössä (18–26 °C) valolta suojattuna. Säilytä muita reagensseja jääkaapissa (2–8 °C).

TRIZMAL™ 6.3 -konsentraatti, TRIZMAL™ 7.6 -konsentraatti ja sitraattiliuos soveltuvat käytettäväksi, kun mikrobikasvua ei ole. Muut reagenssit ovat stabiileja etiketeissä ilmoitettuaan viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Pilaantumisen

Hävitä TRIZMAL™-konsentraatti ja sitraattiliuos, jos mikrobikasvua on havaittavissa. Hävitä hematoksyliiniliuos, Gillin nro 3, jos liuos muuttuu ruskeaksi (ylioksidoinut ilman vaikutuksesta) tai violetiksi (happamuuden häviäminen).

Valmistelu

Lämmitä kaikki reagenssit huoneenlämpöiseksi (18–26 °C) ennen käyttöä. Esteraasireagenssit toimitetaan käyttövalmiina.

Sitraatti-asetoni-formaldehydifiksatiivi: Lisää 25 ml:aan sitraattiliuosta 65 ml asetonia ja 8 ml 37-prosenttista formaldehydiä. Laita lasipulloon ja sulje se tiiviisti. Säilytä jääkaapissa (2–8 °C). Anna tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C) ennen käyttöä. Liuos on stabiili enintään neljä viikkoa, jos sitä säilytetään tiiviisti suljettuna jääkaapissa.

Varotoimet

Näiden pakkausten in vitro -diagnostiset (IVD) laitteet on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa kliinisessä laboratorioympäristössä. Nämä IVD-laitteet on tarkoitettu vain pätevän ammattihenkilöstön käyttöön. In vitro -diagnostisia Sigma-Aldrich-laitteita saa käyttää laboratoriohenkilöstö, joka on koulutettu käsittelemään mahdollisesti tartuntavaarallisia ihmiseräisiä näytteitä ja käyttämään mikroskooppeja ja muita laboratoriotarvikkeita ja jolla on riittävä värinäkö ja näöntarkkuus värien ja muiden kohteiden erottamiseen mikroskoopilla.

Normaaleja laboratorioreagenssien käsittelyyn liittyviä varotoimia tulee noudattaa. Hävitä jätteet kaikkien paikallisten, alueellisten ja kansallisten määräysten mukaisesti.

Menettely

Näytteenotto

Millään tunnetulla testimenetelmällä ei voida täysin taata, että veri- tai kudosnäytteet eivät tartuttaisi infektiota. Siksi kaikkia verijohdannaisia ja kudosnäytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuntavaarallisina.

Verta, luuytimen sivelyvalmisteita, kudoskosketusvalmisteita ja sytosentrifugivalmisteita voidaan käyttää sekä α-naftyyliasetaattiesteraasin että naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasin kanssa. Antikoagulanttina käytetään joko EDTA:ta tai hepariinia.⁹ Jäädytettyjä ja parafiiniin valettuja kudoksia voidaan käyttää naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasin kanssa. α-naftyyliasetaattiesteraasia voidaan käyttää onnistuneesti jäädyetyillä kudosleikkeillä.¹⁰ Veren tai luuytimen sivelyvalmisteita voidaan säilyttää kiinnitettynä huoneenlämmössä (18–26 °C) useita viikkoja tai kiinnittämättöminä useita päiviä ilman huomattavaa muutosta toiminnassa.^{4,9} Älä lähetä kokoverta määritettäväksi toisiin laboratorioihin. Lähetä kiinnitettyjä tai kiinnittämättömiä objektilaseja. Objektilasit on pidettävä viileinä kuljetuksen aikana. Anna sivelyvalmisteiden kuivua vähintään yksi tunti ennen kiinnitystä.

Menetelmän rajoitukset

Kuvatut menetellyt suoritetaan 37 °C:ssa. Jos reagenssit eivät ole tässä lämpötilassa, voidaan saada heikkoja tai negatiivisia reaktioita. Lämpötilat suositellaan tarkistamaan tarkalla lämpömittarilla. Vesihauteet kontrolloidussa lämpötilassa ovat tehokkaampia kuin lämminilmainkubaattorit, ja niitä tulisi käyttää sytokemiallisissa entsyymimenetelmissä. Lämmonsiirto lasin läpi on nopeampaa kuin muovin läpi, joten menetelmässä tulisi käyttää lasisia Coplin-astioita.

Monet entsyymijärjestelmät ovat herkkiä vähäisille pesuainejäämille. Lasiastoiden pesu laimennetulla valkaisuaineella ja huuhteleminen runsaalla määrällä deionisoitua vettä estää pesuaineen vaikutuksen soluentsyymeihin.

Reagenssit-osiossa kuvattu fiksatiivijärjestelmä sisältää formaldehydiä. Jos fiksatiivia ei poisteta kokonaan voimakkaalla huuhtelulla, kuivumisen aikana objektilaseihin tiivistynyt tai märistät objektilaseista jääneet aldehydijäämät voivat inkubointijärjestelmään joutuessaan johtaa entsyymin inhibition, vaikka jäämät olisivat kuinka vähäisiä tahansa. Jotta veren sivelyvalmiste ei häviä huuhteluprosessin aikana, suuntaa vesivirta objektilasin päälle huuhtelun reunan yläpuolelta. Huuhtele objektilasin molemmat puolet.

Tulokset perustuvat jossain määrin subjektiiviseen tulkintaan. Yksittäisten laboratorioiden on määriteltävä omat normaalilueensa.

Huomautukset

Sigma-pakkausten 390A ja 91C käyttäjien on noudatettava erityistä varovaisuutta käyttäessään TRIZMA®-puskurikonsentraatteja 913 ja 903C, sillä ne eivät ole keskenään vaihdettavissa. Väärän puskurin käyttö johtaa negatiiviseen reaktioon.

Menettely

Kuvatut menetellyt suoritetaan 37 °C:ssa.

Naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasimenetelmä

1. Esilämmitä substraattikäyttöä varten riittävä määrä deionisoitua vettä 37 °C:seen. Tarkista lämpötila ennen käyttöä.
2. Lisää juuri ennen kiinnitystä 1 ml natriumnitriittiliuosta 1 ml:aan nopeaa puna-violetti-LB-pohjaliuosta koeputkessa. Sekoita varovasti kääntelemällä ja anna asettua kaksi minuuttia. Kaasukliöpien aktiivista kehittymistä on vältettävä.
3. Lisää vaiheessa 2 valmistettu liuos 40 ml:aan vaiheessa 1 esilämmitettyä deionisoitua vettä.
4. Lisää 5 ml TRIZMAL™ 6.3 -puskurikonsentraattia. (Katso Huomautus-kohta.)
5. Lisää 1 ml naftoli-AS-D-klooriasetaattiliuosta. Liuoksen pitäisi muuttua punaiseksi. Sekoita hyvin ja kaada Coplin-astiaan.
6. Anna sitraatti-asetoni-formaldehydi (CAF) -liuoksen tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C). Kiinnitä objektilasit upottamalla ne CAF-liuokseen 30 sekunniksi.
7. Huuhtele objektilaseja huolellisesti juoksevalle deionisoidulla vedellä 45–60 sekunnin ajan ja aseta sitten vaiheessa 5 valmistettuun liuokseen. Älä päästä objektilaseja kuivumaan.
8. Inkuboi 15 minuuttia 37 °C:ssa valolta suojattuna.

9. Poista objektilasit 15 minuutin kuluttua ja huuhtelee huolellisesti deionisoidulla vedellä vähintään kahden minuutin ajan.
10. Vastavärjää kaksi minuuttia hematoksyliiniliuoksessa, Gillin nro 3.
11. Huuhtelee vesijohtovedellä ja anna kuivua.
12. Arvioi mikroskooppisesti. Jos peittäminen on tarpeen, käytä vain vesipohjaista petausainetta.

Huomautukset

- Columbia-astioita käytettäessä reagenssimäärät on jaettava viidellä.
- Jos substraatti (katso vaihe 5) näyttää samealta, anna sen tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C) ja sekoita hyvin.
- Jos objektilasit on kiinnitetty etukäteen ja varastoitu, ohita kiinnitys (vaiheet 6 ja 7) ja aloita kuivien, etukäteen kiinnitettyjen objektilasien värjäys vaiheesta 8.

α-naftyyliasetaatistiesteraasimenetelmä

1. Esilämmitä substraattikäyttöä varten riittävä määrä deionisoitua vettä 37 °C:seen. Tarkista lämpötila ennen käyttöä.
2. Lisää juuri ennen kiinnitystä 1 ml natriumnitriittiliuosta 1 ml:aan nopeaa sini-BB-pohjaliuosta koeputkessa. Sekoita kääntelemällä ja anna asettua ainakin kaksi minuuttia. Väri muuttuu likaisen ruskeasta syväkeltaiseksi. Kaasukuplien aktiivista kehitymistä on vältettävä.
3. Lisää vaiheessa 2 valmistettu liuos 40 ml:aan vaiheessa 1 esilämmitettyä deionisoitua vettä.
4. Lisää 5 ml TRIZMAL™ 7.6 -puskurikonsentraattia.
5. Lisää 1 ml α-naftyyliasetaattiliuosta. Liuoksen pitäisi muuttua vihertäväksi. Sekoita hyvin ja kaada Coplin-astiaan.
6. Anna sitraatti-asetoni-formaldehydi (CAF) -liuoksen tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C). Kiinnitä objektilasit upottamalla ne CAF-liuokseen 30 sekunniksi. Ravista voimakkaasti viimeiset viisi sekuntia.
7. Huuhtelee objektilaseja huolellisesti juoksevalle deionisoidulla vedellä 45–60 sekunnin ajan ja aseta sitten vaiheessa 5 valmistettuun liuokseen. Älä päästä objektilaseja kuivumaan.
8. Inkuboi 30 minuuttia 37 °C:ssa valolta suojattuna.
9. Poista objektilasit 30 minuutin kuluttua ja huuhtelee huolellisesti vähintään kahden minuutin ajan juoksevalle deionisoidulla vedellä.
10. Vastavärjää kaksi minuuttia hematoksyliiniliuoksessa, Gillin nro 3.
11. Huuhtelee vesijohtovedellä ja anna kuivua.
12. Arvioi mikroskooppisesti. Jos peittäminen on tarpeen, käytä vain vesipohjaista petausainetta.

Huomautukset

- Columbia-astioita käytettäessä reagenssimäärät on jaettava viidellä.
- Jos substraatti (katso vaihe 5) näyttää samealta, anna sen tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C) ja sekoita hyvin.
- Jos objektilasit on kiinnitetty etukäteen ja varastoitu, ohita kiinnitys (vaiheet 6 ja 7) ja aloita kuivien, etukäteen kiinnitettyjen objektilasien värjäys vaiheesta 8.

Kaksoisvärjäsesteraasimenetelmä

1. Suorita α-naftyyliasetaatistiesteraasitesti menetelmäkuvauksen mukaisesti. Älä vastavärjää.
2. Huuhtelee objektilasia viisi minuuttia deionisoidussa vedessä.
3. Suorita naftoli-AS-D-klooriasetaattistiesteraasitesti menetelmäkuvauksen vaiheiden 1–12 mukaisesti. Jätä vaihe 6 pois.

Huomautus

Nopea puna-violetti-LB-pohjaliuos voidaan korvata nopealla sini-BB-pohjaliuoksella, jos naftoli-AS-D-klooriasetaattistiesteraasille halutaan mieluummin sininen granulaatio.

α-naftyyliasetaatistiesteraasi fluoridi-inhibitiomenetelmällä

Vaikka α-naftyyliasetaatistiesteraasia esiintyy pääasiassa monosyyttisen linjan soluissa, kun menettely suoritetaan kuttavalla tavalla, on huomattava, että megakaryosyytit ja erytroidiset esiasteet ovat positiivisia täällä entsyymillä.¹¹ Lymfosyytit ja jotkut kypsät granulosityytit osoittavat myös satunnaista positiivisuutta.⁴ Jotta nämä solut voidaan erottaa ratkaisevasti monosyyteistä, inkubointijärjestelmään sisällytetään natriumfluoridia. Monosyyttientsyymi inaktivoituu tämän yhdisteen läsnäollessa.¹² Fluoridi-inhibitiotestin suorittamiseen voidaan käyttää seuraavaa menettelyä.

1. Lisää 2 ml natriumnitriittiliuosta 2 ml:aan nopeaa sini-BB-pohjaliuosta. Sekoita varovasti kääntelemällä. Anna asettua kaksi minuuttia.
2. Merkitse kaksi dekanterilas A ja B ja lisää seuraavat aineet:
- | | Dekanterilasi A | Dekanterilasi B |
|--|-----------------|-----------------|
| Esilämmitetty 37-asteinen deionisoitu vesi | 40 ml | 40 ml |
| Vaiheessa 1 diatsotoitu nopea sini-BB | 2 ml | 2 ml |
| TRIZMAL™ 7.6 -konsentraatti | 5 ml | 5 ml |
| α-naftyyliasetaattiliuos | 1 ml | 1 ml |
| Natriumfluoridiliuos | - | 1 ml |
3. Sekoita hyvin ja kaada A- ja B-merkinnoillä varustettuihin Coplin-astioihin.
4. Suorita α-naftyyliasetaatistiesteraasimenetelmän vaiheet 6–12.

Suorituskykyominaisuudet

Pisteytysmenetelmä

Skannaa sivelyalmiste ja valitse ohut alue, jossa on vain vähän erytrosyyttejä. Naftoli-AS-D-klooriasetaattistiesteraasin toiminta-alueet näkyvät kirrkaanpunaisena granulaationa, α-naftyyliasetaatistiesteraasin mustana granulaationa. Anna luokitukseksi 0–4+ vastaavien solutyypien sytoplasmassa näkyvien yksittäisten värien määrän ja voimakkuuden perusteella. Pisteytysominaisuudet perustuvat jossain määrin subjektiiviseen tulkintaan. Ehdotettu pisteytystapa esitetään taulukossa 1. Johtopäätökset keskittyvät värjäytymisen ja värjäytymättömyyden suhteeseen.

Taulukko 1. Pisteytysominaisuudet

Solun luokitus	Värjäyksen voimakkuus	Tulkinta
0+	Ei yhtään	–
1+	Heikko tai kohtalainen	±
2+	Kohtalainen tai voimakas	+
3+	Voimakas	+
4+	Kirkas	+

Odotetut havainnot

Naftoli-AS-D-klooriasetaattistiesteraasi

(Nopea puna-violetti-LB) – Entsyymiä pidetään yleensä spesifisenä granulosityttisen linjan soluille. Toiminta-alueilla näkyy kirrkaanpunaista granulaatiota. Monosyyteissä ja lymfosyyteissä toiminta on heikkoa tai olematonta.

α-naftyyliasetaatistiesteraasi

(Nopea sini-BB) – Entsyymiä havaitaan pääasiassa monosyyteissä, makrofageissa ja histiosyyteissä, ja sitä ei käytännössä esiinny granulosityteissä. Monosyyteissä tulisi näkyä mustaa granulaatiota. Lymfosyyteissä voi joskus ilmetä entsyymitoimintaa.

Kaksoisvärjäsesteraasi

Kaksoisvärjäysmenetelmällä otetut näytteet osoittavat granulositytt punaisella granulaatiolla ja monosyytit mustalla granulaatiolla.

α-naftyyliasetaatistiesteraasi fluoridi-inhibitiolla

Kaikki monosyyttisen linjan solut ovat negatiivisia entsyymitoiminnan osalta, lukuun ottamatta kudonsäytteiden erilaistuneita histiosyyttejä tai erikoistuneita makrofageja, jotka voivat myös olla resistenttejä natriumfluoridille.¹⁰

Laadunvalvonta

Reagenssijärjestelmää on valvottava positiivisten ja negatiivisten kontrolliohjektilasien avulla.

Positiiviset kontrolliohjektilasit voidaan valmistaa spesifeistä solulinjoista, joiden tiedetään olevan positiivisia.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää myös antikoaguloitua verta normaaleista näytteistä (mieluiten tavallista suuremmalla monosyyttimäärällä, jos käytetään α-naftyyliasetaatistiesteraasimenetelmää). Silloin värjäys ei kuitenkaan ole yhtä voimakas ja positiivisten solujen määrä on pienempi.

Tunnetusti negatiivisten potilaiden objektilaseja voidaan käyttää negatiivisena kontrollina. Jos sellaisia ei ole saatavilla, näyteen värjäys inkubointiseoksessa ilman substraattia antaa halutut tulokset. Ensimmäisen vaihtoehdon käyttö on kuitenkin erittäin suositeltavaa.

Jos havaitut tulokset eroavat odotetuista tuloksista, ota yhteyttä Sigma-Aldrichin tekniseen palveluun.

Analyttiset suorituskykyominaisuudet

Kaikilla kohderakenteilla suoritetuista testeistä saadut analyttiset suorituskykytulokset vahvistavat 100-prosenttisen herkkyyden, spesifisyyden ja toistettavuuden.

Luettelonro	Tuotteen kuvaus	Kohde	Määrittymisen sisäisen spesifisyys	Määrittymisen sisäinen herkkyys	Määritysten välinen spesifisyys	Määritysten välinen herkkyys
911	Naftoli-AS-D-klooriasetaattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
912	Nopea puna-violetti-LB-pohjaliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
913	TRIZMAL™ 6.3 -konsentraatti	Osmolaliteetti	3/3	3/3	3/3	3/3
		pH	3/3	3/3	3/3	3/3
914	Natriumnitraattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
915	Sitraattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
916	α-naftyyliasetaattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
917	Nopea sini-BB-pohjaliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
918	TRIZMAL™ 7.6 -konsentraatti	Osmolaliteetti	3/3	3/3	3/3	3/3
		pH	3/3	3/3	3/3	3/3
919	Natriumnitriittiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
GHS3	Hematoksyliiniliuos, Gillin nro 3	Tumat	3/3	3/3	3/3	3/3

Varoitukset ja vaarat

Katso päivitetty riski-, vaara- ja turvallisuustiedot käyttöturvallisuustiedotteesta ja tuotemerkinnöistä.

91A:



H226 Syttyvä neste ja höyry.

H290 Voi syövyttää metalleja.

H301 Myrkyllistä nieltynä.

H312 + H332 Haitallista joutuessaan iholle tai hengitettynä.

H319 Ärsyttää voimakkaasti silmiä.

H370 Vahingoittaa elimiä (silmit, keskushermosto).

H412 Haitallista vesieläöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.

P210 Suojaa lämmöltä, kuumilta pinnoilta, kipinöiltä, avotulelta ja muilta sytytyslähteiltä. Tupakointi kielletty.

P273 Vältettävä päästämistä ympäristöön.

P280 Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

P301 + P310 JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota välittömästi yhteys MYRKYTUSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.

P303 + P361 + P353 JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE (tai hiuksiin): Riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhto iho vedellä.

P304 + P340 + P312 JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja varmista vaivaton hengitys. Ota yhteys MYRKYTUSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.

91C:



- H290 Voi syövyttää metalleja.
- H302 Haitallista nieltynä.
- H315 Ärsyttää ihoa.
- H317 Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion.
- H318 Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa.
- H335 Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä.
- H360FD Saattaa heikentää hedelmällisyyttä. Saattaa vaurioittaa sikiötä.
- H373 Saattaa vahingoittaa elimiä (munuaiset) nieltynä pitkäaikaisessa tai toistuvassa altistumisessa.
- P202 Lue varoitukset huolellisesti ennen käsittelyä.
- P280 Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.
- P301 + P312 JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.
- P302 + P352 JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä.
- P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuho huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.
- P308 + P313 Altistumisen tapahduttua tai jos epäillään altistumista: Hakeudu lääkäriin.

Jos tämän laitteen käytön aikana tai sen seurauksena ilmenee vakava vaaratilanne, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

Symbolien selitykset

Symbolit standardin EN ISO 15223-1:2021 mukaisesti

	Valmistaja		Luettelonumero
	Katso käyttöohje		Eräkoodi
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Euroopan unionissa		Vaatimustenmukaisuusvakuutus Euroopan unionin määräysten mukaisesti (IVDR-asetus 2017/746)
	Viimeinen käyttöpäivä		In vitro -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite
	Lämpötilarajoitus		Huomio
	Valmistuspäivä		Maahantuoja
	Valtuutettu edustaja Sveitsissä		

Lähteet

- Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
- Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
- Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
- Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
- Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
- Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
- Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
- Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
- Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
- Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Yhteystiedot

Voit tehdä tilauksen verkkosivuiltamme osoitteessa [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Tekniseen palveluumme voi ottaa yhteyttä teknisen palvelun sivulla osoitteessa [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Versiohistoria

Versio 4.0	2014
Versio 5.0	2016
Versio 6.0	2023

Siirretty uuteen pohjaan, jossa on ajantasaiset brändimerkit. Maininta ammattikäytöstä lisätty käyttötarkoitukseen ja varotoimiin. Lausuma diagnosointiavusta siirretty käyttötarkoituksen alle. Käyttötarkoitus tarkistettu IVDR-ohjeistusten mukaisesti. "Materiaalin käyttöturvallisuustiedote" päivitetty muotoon "käyttöturvallisuustiedote". Yhteystiedot päivitetty. Poistettu ohje CLSI-ohjeistuksen noudattamisesta näytteenotossa. Symboliosiota poistettu "EN 980" ja tilalle vaihdettu "EN ISO 15223-1:2021". Lisätty haittatapahtumien yhteydessä käytettävät yhteystiedot. Kirjallisuusviitteet päivitetty. Lisätty versiohistoriataulukko. Lisätty kohta Varoitukset ja vaarat. Lisätty CH-REP-tiedot.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

M-alkukirjain ja Sigma-Aldrich ovat Merck KGaA -yhtiön, Darmstadt, Saksa, tai sen tytäryhtiöiden tavaramerkkejä. Kaikki muut tavaramerkit ovat haltijoidensa omaisuutta. Yksityiskohtaiset tavaramerkkitiedot ovat saatavilla julkisista lähteistä.

Sigma-Aldrich®

Gebruiksaanwijzing

Leukocyt α-naftylacetaat (niet-specifieke esterase) en leukocyt naftol AS-D-chlooracetaat (specifieke esterase)-kit

Procedurenr. 91



Beoogd gebruik

Naftol AS-D chlooracetaatesterase en α-naftylacetaatesterase-kits van Sigma-Aldrich zijn bedoeld als een algemene histologische kleurstof voor laboratoriumgebruik. Naftol AS-D chlooracetaatesterase en α-naftylacetaatesterase-reagentia zijn uitsluitend bedoeld voor professioneel 'in-vitrodiagnostisch gebruik'. Deze handmatige, kwalitatieve histochemische procedure toont de naftol AS-D chlooracetaatesterase- en α-naftylacetaatesterase-activiteit aan in leukocyten van humaan bloed, beenmergfijls of 'tissue touch'-preparaten. Histologische visualisatie van cellulaire leukocyttesterasen is een unieke techniek die momenteel veel gebruikt wordt in de geneeskunde.

Cellulaire esterasen zijn alomtegenwoordig en lijken een reeks verschillende enzymen te vertegenwoordigen die op geselecteerde substraten reageren. Onder gedefinieerde reactieomstandigheden kan het mogelijk zijn om hemopoëtische celtypen te bepalen met behulp van specifieke esterasesubstraten. De beschreven methoden bieden hematologen en hematopathologen middelen om granulocyten van monoccyten te onderscheiden.¹⁻⁷

Om de test uit te voeren, worden bloed, beenmergfijls of 'tissue touch'-preparaten geïncubeerd met naftol AS-D-chlooracetaat (NCAE) of α-naftylacetaat (NAE) in aanwezigheid van vers gevormd diazoniumzout. Bij enzymatische hydrolyse van esterbindingen komen vrije naftolverbindingen vrij. Deze koppelen met het diazoniumzout en vormen sterk gekleurde afzettingen op de plaatsen waar het enzym actief is.

De meest recente procedures, waaronder die van Sigma-Aldrich, maken gebruik van stabiele diazoniumzouten. Deze worden gevormd door een arylamine te laten reageren met natriumnitriet in een zuur medium.⁸ Het resulterende diazoniumchloride (meestal instabiel) kan vervolgens worden behandeld met verbindingen zoals zinkchloride, zinksulfaat of naftaleen-1,6-disulfaat, waarbij stabiele zouten worden gevormd. Deze stabilisatoren kunnen een duidelijke remming uitoefenen op sommige enzymatische systemen, terwijl de diazoniumchloriden minder remmend werken.⁸ Om deze reden levert Sigma-Aldrich nu stabiele oplossingen voor Fast Red Violet LB-base, Fast Blue BB-base en natriumnitriet voor esterasecytochemie. Om deze methoden verder te vereenvoudigen zijn stabiele oplossingen van naftol AS-D chlooracetaat en α-naftylacetaat opgenomen. De beschikbaarheid van deze stabiele oplossingen stelt de klant in staat om de volumes van werkreagentia aan te passen aan de behoefte, waardoor verspilling wordt voorkomen.

Reagentia

Naftol AS-D chlooracetaat-oplossing (cat. nr. 911-10ML)

Naftol AS-D chlooracetaat, 8 mg/mL, en stabilisator. Waarschuwing. Veroorzaakt oogirritatie. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Blijven spoelen.

Fast Red Violet LB-base-oplossing (cat. nr. 912-10ML)

Fast red violet LB-base, 15 mg/mL, in 0,4 mol/L zoutzuur, met stabilisator. Gevaar. Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsels. Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/gezichtsbescherming.

TRIZMAL™ 6.3-concentraat (cat. nr. 913-50ML)

TRIZMA®-maleaat, 1 mol/L, met oppervlakteactieve stof. pH 6,3 ± 0,15 bij 25 °C. Gevaar. Veroorzaakt huidirritatie. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/gezichtsbescherming.

Natriumnitrietoplossing (cat. nr. 914-10ML)

Natriumnitriet, 0,1 mol/L

Citraatoplossing (cat. nr. 915-50ML)

Citroenzuur, 18 mmol/L, natriumcitraat, 9 mmol/L, natriumchloride, 12 mmol/L, en oppervlakteactieve stof, pH 3,6 ± 0,1 bij 25 °C

α-naftylacetaat-oplossing (cat. nr. 916-10ML)

α-naftylacetaat, 12,5 mg/mL, in methanoloplossing met stabilisatoren. Gevaar. Ontvlambare vloeistof en damp. Giftig bij inslikken. Schadelijk bij contact met de huid of bij inademing. Veroorzaakt een milde huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Veroorzaakt schade aan organen.

Fast Blue BB-base-oplossing (cat. nr. 917-10ML)

Fast Blue BB-base, 15 mg/mL, C.I. 37175, in 0,4 mol/L zoutzuur met stabilisatoren. Waarschuwing. Schadelijk bij inslikken. Veroorzaakt een milde huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen.

TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat (cat. nr. 918-50ML)

TRIZMA®-maleaat, 1 mol/L, met oppervlakteactieve stof. pH 7,6 ± 0,15 bij 25 °C. Gevaar. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. Schadelijk voor in het water levende organismen.

Hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3 (cat. nr. GHS3-50ML)

Gecertificeerd hematoxyline, 6,0 g/L, C.I. 75290, natriumjodaat, 0,6 g/L en aluminiumsulfaat, 52,8 g/L en stabilisatoren. Gevaar. Schadelijk bij inslikken. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/gezichtsbescherming.

Natriumfluorideoplossing (cat. nr. 919-25ML)

Natriumfluoride, 20 g/L. Waarschuwing. Schadelijk bij inslikken. Veroorzaakt een milde huidirritatie.

Vereiste, maar niet meegeleverde speciale materialen

- Aceton, ACS-reagens
- Formaldehyde, 37%, ACS
- Natriumfluorideoplossing, cat. Nr. 919-25ML (vereist voor α-naftylacetaatesterase met fluorideremming-procedure).

Opslag en stabiliteit

Bewaar hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3 bij kamertemperatuur (18-26 °C), afgeschermd van licht. Bewaar overige reagentia in de koelkast (2-8 °C).

TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat, TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat en citraat-oplossing zijn geschikt voor gebruik in afwezigheid van microbiële groei. Overige reagentia zijn stabiel tot de vervaldatum op de etiketten.

Verslechtering

Gooi TRIZMAL™-concentraat en citraatoplossing weg als er sprake van microbiële groei is. Gooi hematoxyline-oplossing Gill nr. 3 weg als de oplossing bruin wordt (overgeoxideerd door lucht) of paars (zuurgraadverlies).

Voorbereiding

Vóór gebruik alle reagentia opwarmen tot kamertemperatuur (18-26 °C). Esterasereagentia worden gebruiksklaar geleverd.

Citraat-aceton-formaldehyde-fixatief: Voeg aan 25 mL citraatoplossing 65 mL aceton en 8 mL 37%-formaldehyde toe. Doe dit in een glazen fles en sluit goed af. Bewaar in de koelkast (2-8 °C). Breng vóór gebruik op kamertemperatuur (18-26 °C). Stabiel gedurende 4 weken,mits goed afgesloten bewaard in de koelkast.

Voorzorgsmaatregelen

De IVD's in deze kits zijn bedoeld voor in-vitrodiagnostisch gebruik in een klinische laboratoriumomgeving. Deze IVD's zijn uitsluitend bestemd voor professioneel gebruik door gekwalificeerd personeel. IVD's van Sigma-Aldrich mogen bediend worden door laboratoriumpersoneel dat opgeleid is om om te gaan met humane monsters die infectieus kunnen zijn, microscopen en andere laboratoriumapparatuur te gebruiken en met voldoende kleurwaarneming en gezichtsscherpte om kleuren en andere objecten onder een microscoop te onderscheiden.

De normale voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van laboratoriumreagentia moeten worden opgevolgd. Voer afval af met inachtneming van alle plaatselijke, provinciale of nationale voorschriften.

Procedure

Monsterafname

Geen enkele bekende testmethode kan volledige zekerheid bieden dat bloedmonsters of weefsels geen infectie overdragen. Daarom moeten alle bloederivaten of weefselsonsters als mogelijk infectieus worden beschouwd.

Bloed, beenmergfijls, 'tissue touch'-preparaten en cytocentrifugepreparaten kunnen worden gebruikt met zowel α-naftylacetaatesterase als naftol AS-D-chlooracetaatesterase. EDTA of heparine dienen als antistollingsmiddel.⁹ Ingevroren en in paraffine ingebedde weefsels kunnen met naftol AS-D-chlooracetaatesterase worden gebruikt. α-naftylacetaatesterase kan met succes op bevroren weefselcoupons worden gebruikt.¹⁰ Bloed of beenmergfijls kunnen gefixeerd bij kamertemperatuur (18-26 °C) gedurende enkele weken of niet-gefixeerd gedurende enkele dagen worden bewaard zonder merkbare verandering in activiteit.^{1,9} Verstuur geen volbloed voor analyse naar andere laboratoria. Verstuur gefixeerde of niet-gefixeerde glaasjes. De glaasjes moeten koel worden bewaard tijdens transport. Laat de films ten minste 1 uur drogen vóór fixatie.

Bepkeringen van de procedure

De beschreven procedures worden uitgevoerd bij 37 °C. Als de reagentia niet op deze temperatuur zijn, kunnen er zwakke of negatieve reacties optreden. Het wordt aanbevolen om de temperatuur te controleren met een nauwkeurige thermometer. Waterbaden met gecontroleerde temperatuur zijn effectiever dan incubators met warme lucht en moeten gebruikt worden voor cytochemische enzymmethoden. Warmteoverdracht door glas is sneller dan door plastic, dus moeten glazen Coplin-potten worden gebruikt.

Veel enzymsystemen zijn gevoelig voor minieme sporen van detergens. Het wassen van glaswerk met verdund bleekmiddel gevolgd door spoelen met overmatige hoeveelheden gede-ioniseerd water voorkomt het detergentseffect op cellulaire enzymen.

Het fixeersysteem dat wordt beschreven in de paragraaf 'Reagentia' bevat formaldehyde. Als het fixatief niet volledig wordt verwijderd door krachtig spoelen, kan elke hoeveelheid aldehyde, geconcentreerd op aan de lucht gedroogde objectglaasjes of sporen van natte objectglaasjes, die aan het incubatiesysteem wordt toegevoegd, leiden tot remming van het enzym. Richt de waterstraal op het glaasje boven de veerand om verlies van bloedfilm tijdens het spoelen te voorkomen. Spoel beide zijden van het glaasje.

Resultaten zijn gebaseerd op een zekere mate van subjectieve interpretatie. Individuele laboratoria moeten hun eigen normale waarden vaststellen.

Opmerkingen

Gebruikers van Sigma-kits 390A en 91C moeten voorzichtig zijn bij het gebruik van TRIZMA®-bufferconcentraten catalogusnr. 913 en 903C, aangezien deze niet onderling verwisselbaar zijn. Gebruik van de verkeerde buffer resulteert in een negatieve reactie.

Procedure

De beschreven procedures worden uitgevoerd bij 37 °C.

Naftol AS-D chlooracetaatesteraseprocedure

1. Verwarm voldoende gede-ioniseerd water voor substraatgebruik voor tot 37 °C. Controleer de temperatuur vóór gebruik.
2. Voeg onmiddellijk vóór de fixatie 1 mL natriumnitriet-oplossing toe aan 1 mL Fast Red Violet LB-base-oplossing in een reageerbuis. Meng voorzichtig door omkieren en laat 2 minuten staan. Actieve ontwikkeling van gasbellen moet worden vermeden.
3. Voeg de in stap 2 bereide oplossing toe aan 40 mL voorverwarmd gede-ioniseerde water uit stap 1.
4. Voeg 5 mL TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat toe. (Zie 'Opmerking')
5. Voeg 1 mL naftol AS-D chlooracetaat-oplossing toe. De oplossing moet rood worden. Meng goed en giet in een Coplin-pot.
6. Breng de citraat-aceton-formaldehyde (CAF)-oplossing op kamertemperatuur (18-26 °C). Fixeer de objectglaasjes door ze 30 seconden onder te dompelen in CAF-oplossing.
7. Spoel de objectglaasjes grondig gedurende 45-60 seconden onder stromend gede-ioniseerd water en plaats ze vervolgens in de oplossing uit stap 5. Laat de objectglaasjes niet drogen.

- Incubeer 15 minuten bij 37 °C, afgeschermd van licht.
- Verwijder de objectglasjes na 15 minuten en spoel ze grondig af met gede-ioniseerd water gedurende ten minste 2 minuten.
- Pas gedurende 2 minuten tegenkleuring toe in hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3.
- Spoel af met kraanwater en laat ze aan de lucht drogen.
- Evalueer microscopisch. Als coverslippen nodig is, gebruik dan alleen een waterig inbedmiddel.

Opmerkingen

- Deel voor gebruik met Columbia-potjes de reagensvolumes door 5.
- Als het substraat (zie stap 5) troebel lijkt, breng het dan op kamertemperatuur (18-26 °C) en meng goed.
- Als de objectglasjes vooraf gefixeerd en bewaard zijn, sla dan het fixeren (stap 6 en 7) over en begin met het kleuren van droge, vooraf gefixeerde objectglasjes bij stap 8.

α-naftyl acetaatesterase-procedure

- Verwarm voldoende gede-ioniseerd water voor substraatgebruik voor tot 37 °C. Controleer de temperatuur vóór gebruik.
- Voeg onmiddellijk vóór de fixatie 1 mL natriumnitriet-oplossing toe aan 1 mL Fast Blue BB base-oplossing in een reageerbuis. Meng voorzichtig door omkeren en laat ten minste 2 minuten staan. De kleur verandert van vuilbruin naar diepgeel. Actieve ontwikkeling van gasbellen moet worden vermeden.
- Voeg de in stap 2 bereide oplossing toe aan 40 mL voorverwarmd gede-ioniseerde water uit stap 1.
- Voeg 5 mL TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat toe.
- Voeg 1 mL α-naftylacetaat-oplossing toe. De oplossing moet groenig worden. Meng goed en giet in een Coplin-pot.
- Breng de citraat-aceton-formaldehyde (CAF)-oplossing op kamertemperatuur (18-26 °C). Fixeer de objectglasjes door ze 30 seconden onder te dompelen in CAF-oplossing. Beweeg de objectglasjes krachtig gedurende de laatste 5 seconden.
- Spoel de objectglasjes grondig gedurende 45-60 seconden onder stromend gede-ioniseerd water en plaats ze vervolgens in de oplossing uit stap 5. Laat de objectglasjes niet drogen.
- Incubeer 30 minuten bij 37 °C, afgeschermd van licht.
- Verwijder de objectglasjes na 30 minuten en spoel ze grondig af onder stromend gede-ioniseerd water gedurende ten minste 2 minuten.
- Pas gedurende 2 minuten tegenkleuring toe in hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3.
- Spoel af met kraanwater en laat ze aan de lucht drogen.
- Evalueer microscopisch. Als coverslippen nodig is, gebruik dan alleen een waterig inbedmiddel.

Opmerkingen

- Deel voor gebruik met Columbia-potjes de reagensvolumes door 5.
- Als het substraat (zie stap 5) troebel lijkt, breng het dan op kamertemperatuur (18-26 °C) en meng goed.
- Als de objectglasjes vooraf gefixeerd en bewaard zijn, sla dan het fixeren (stap 6 en 7) over en begin met het kleuren van droge, vooraf gefixeerde objectglasjes bij stap 8.

Dubbele kleuring esteraseprocedure

- Voer de α-naftylacetaatesterase-test uit zoals beschreven in Procedure. Niet tegenkleuren.
- Spoel de glasjes 5 minuten met gede-ioniseerd water.
- Voer de naftol AS-D chlooracetaatesterase-test uit zoals beschreven in Procedure, stappen 1-12. Sla stap 6 over.

Opmerking

Fast Blue BB base-oplossing kan worden vervangen door Fast Red Violet LB base-oplossing als blauwe granulatie de voorkeur heeft voor naftol AS-D chlooracetaatesterase.

α-naftylacetaatesterase met fluorideremming-procedure

Hoewel α-naftylacetaatesterase voornamelijk wordt aangetroffen in cellen van monocytair afstamming wanneer het wordt uitgevoerd zoals beschreven, moet bekend zijn dat megakaryocyten en erythroïde precursors positief zijn voor dit enzym.¹¹ Lymfocyten en sommige rijpe granulocyten vertonen ook incidentele positiviteit.⁴ Om deze cellen onomstotelijk van monocyten te onderscheiden, wordt natriumfluoride in het incubatiesysteem opgenomen. Het monocytenenzym wordt gedeactiveerd in de aanwezigheid van deze verbinding.¹² De volgende procedure kan worden gebruikt om de fluorideremmingstest uit te voeren.

- Voeg aan 2 mL Fast Blue BB base-oplossing 2 mL natriumnitriet-oplossing toe. Meng door voorzichtig omkeren. Laat 2 minuten staan.
- Label 2 bekerglazen A en B en voeg het volgende toe:

	Bekerglas A	Bekerglas B
Voorverwarmd tot 37 °C gede-ioniseerd water	40 mL	40 mL
Gediazotiseerde Fast Blue BB van stap 1	2 mL	2 mL
TRIZMAL™ 7.6-concentraat	5 mL	5 mL
α-naftylacetaat-oplossing	1 mL	1 mL
Natriumfluoride-oplossing	-	1 mL

- Meng goed en giet in Coplin-potten, gelabeld A en B.
- Ga verder zoals beschreven in stappen 6-12 van de α-naftylacetaatesterase-procedure.

Prestatiekenmerken

Scoremethode

Scan de film en selecteer een dun gebied met weinig erythrocyten. Locaties met naftol AS-D chlooracetaatesterase-activiteit verschijnen als helderrode granulatie, α-naftylacetaatesterase als zwarte granulatie. Geef een score 0 tot 4+ op basis van de hoeveelheid en intensiteit van de individuele kleurstoffen in het cytoplasma van de betreffende cellen. Kenmerken van scores zijn gebaseerd op enigszins subjectieve interpretatie. Tabel 1 geeft een suggestie voor een scoreindeling. Conclusies zijn gebaseerd op de relatieve aan- of afwezigheid van kleuring.

Tabel 1. Kenmerken van scoren

Celscore	Kleuringsintensiteit	Interpretatie
0+	Geen	–
1+	Vaag tot matig	±
2+	Matig tot sterk	+
3+	Sterk	+
4+	Schitterend	+

Verwachte waarnemingen

Naftol AS-D chlooracetaatesterase

(Fast Red Violet LB) - Dit enzym wordt meestal beschouwd als specifiek voor cellen van granulocytair afstamming. Locaties van activiteit vertonen helderrode granulatie. De activiteit is zwak of afwezig in monocyten en lymfocyten.

α-naftylacetaatesterase

(Fast Blue BB) - Dit enzym wordt voornamelijk gedetecteerd in monocyten, macrofagen en histiocyten en is vrijwel afwezig in granulocyten. Monocyten moeten zwarte granulatie vertonen. Lymfocyten kunnen een enkele keer enzymactiviteit vertonen.

Dubbele kleuring esterase

Monsters die volgens de dubbele-kleuringsprocedure zijn gekleurd, tonen granulocyten met rode granulatie en monocyten met zwarte granulatie.

α-naftylacetaatesterase met fluorideremming

Alle cellen van monocytair afstamming zullen negatief zijn voor enzymactiviteit, met uitzondering van gedifferentieerde histiocyten of gespecialiseerde macrofagen in weefsel die ook resistent kunnen zijn tegen natriumfluoride.¹⁰

Kwaliteitscontrole

Het reagenssysteem moet gecontroleerd worden met behulp van positieve- en negatieve-controleglasjes.

Positieve-controleglasjes kunnen worden geprepareerd van specifieke cellijnen waarvan bekend is dat ze positief zijn.

Als alternatief kan ook geanticoaguleerd bloed van normale monsters (bij voorkeur met een verhoogd aantal monocyten bij gebruik van de α-naftylacetaatesterase-procedure) worden gebruikt; deze zullen echter een minder intense kleuring geven en minder positieve cellen hebben.

Bekende negatieve patiëntglasjes kunnen als negatieve controle worden gebruikt. Als deze niet beschikbaar zijn, zal het kleuren van een monster in een incubatiemengsel zonder substraat de gewenste resultaten geven. Het gebruik van de eerste optie wordt echter sterk aanbevolen.

Als de waargenomen resultaten afwijken van de verwachte resultaten, neem dan contact op met de technische dienst van Sigma-Aldrich voor assistentie.

Analytische prestatiekenmerken

De resultaten van de analytische prestaties voor de gegeven tests, uitgevoerd op alle doelstructuren, bevestigen 100% gevoeligheid, specificiteit en herhaalbaarheid.

Cat. nr.	Productbeschrijving	Doel	Intra-assay specificiteit	Intra-assay gevoeligheid	Inter-assay specificiteit	Inter-assay gevoeligheid
911	Naftol AS-D chlooracetaat-oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
912	Fast Red Violet LB base-oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
913	TRIZMAL™ 6.3-concentraat	Osmolaliteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
		pH	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
914	Natriumnitraat-oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
915	Citraatoplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
916	α-naftylacetaat-oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
917	Fast Blue BB base-oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
918	TRIZMAL™ 7.6-concentraat	Osmolaliteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
		pH	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
919	Natriumfluoride-oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
GHS3	Hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3

Waarschuwingen en gevaren

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad en de etikettering van het product voor bijgewerkte informatie over risico's, gevaren of veiligheid.

91A:



H226 Ontvlambare vloeistof en damp.

H290 Kan bijtend zijn voor metalen.

H301 Giftig bij inslikken.

H312 + H332 Schadelijk bij contact met de huid of bij inademing.

H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.

H370 Kan schade aan organen veroorzaken (ogen, centraal zenuwstelsel).

H412 Giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.

P210 Verwijderd houden van warmte, hete oppervlakken, vonken, open vuur en andere ontstekingsbronnen. Verboden te roken.

P273 Voorkom lozing in het milieu.

P280 Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming.

P301 + P310 NA INSLIKKEN: Bel onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts.

P303 + P361 + P353 BIJ CONTACT MET DE HUID (of het haar): Trek onmiddellijk alle verontreinigde kleding uit. Spoel de huid af met water.

P304 + P340 + P312 NA INADEMING: Breng de persoon in de frisse lucht en zorg dat hij comfortabel kan ademen. Bel een ANTIGIFCENTRUM/arts als u zich onwel voelt.

91C:



- H290 Kan bijtend zijn voor metalen.
- H302 Schadelijk bij inslikken.
- H315 Veroorzaakt huidirritatie.
- H317 Kan een allergische huidreactie veroorzaken.
- H318 Veroorzaakt ernstig oogletsel.
- H335 Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
- H360FD Kan de vruchtbaarheid schaden. Kan het ongeboren kind schaden.
- H373 Kan bij inslikken schade aan organen (nieren) veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling.
- P202 Pas gebruiken nadat u alle veiligheidsvoorschriften gelezen en begrepen heeft.
- P280 Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming.
- P301 + P312 NA INSLIKKEN: Bel een ANTIGIFCENTRUM/arts als u zich onwel voelt.
- P302 + P352 INDIEN OP DE HUID: Was met veel water.
- P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Blijven spoelen.
- P308 + P313 BIJ blootstelling of ongerustheid: Vraag medisch advies/medische hulp.

Als zich tijdens het gebruik van dit apparaat of als gevolg van het gebruik ervan een ernstig incident heeft voorgedaan, meld dit dan aan de fabrikant en/of zijn gemachtigde vertegenwoordiger en aan uw nationale autoriteit.

Symbooldefinities

Symbolen zoals gedefinieerd in EN ISO 15223-1:2021

	Fabrikant		Catalogusnummer
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing		Batchcode
	Gemachtigd vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap/Europese Unie		Conformiteitsverklaring van de Europese Unie (gedefinieerd in IVDR 2017/746)
	Uiterste gebruiksdatum		Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Temperatuurlimiet		Let op
	Productiedatum		Importeur
	Geeft de bevoegde vertegenwoordiger in Zwitserland aan		

Referenties

1. Beckmann J, Neth R, Gaedick G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975.
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972.
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971.
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957.
7. Moloney WC, McPherson K, Sliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127-130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Contactgegevens

Om een bestelling te plaatsen, bezoek onze website op [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Ga voor technische service naar de technische servicepagina op onze website: [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Herzieningsgeschiedenis

Herz. 4.0	2014
Herz. 5.0	2016
Herz. 6.0	2023
Overgezet naar nieuwe sjabloon met huidige huisstijl. Gespecificeerd voor professioneel gebruik in bedoeld gebruik en voorzorgsmaatregelen. Hulp bij diagnosticering verplaatst naar beoogd gebruik. Herzien beoogd gebruik om aan te sluiten bij IVDR-richtlijnen. Veiligheidsinformatieblad bijgewerkt tot veiligheidsinformatieblad. Contactgegevens bijgewerkt. Instructie om CLSI te volgen voor monsterafname verwijderd. EN 980 verwijderd en gewijzigd in EN ISO 15223-1:2021 voor symbolen. Contactinformatie over melding ongewenste voorvallen toegevoegd. Bijgewerkte literatuurreferenties. Een tabel met de herzieningsgeschiedenis toegevoegd. Waarschuwingen en gevaren toegevoegd. CH-REP informatie toegevoegd.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Navodila za uporabo

Komplet za levkocitni α -naftil acetat (nespecifična esteraza) in levkocitni naftol AS-D kloroacetat (specifična esteraza)

Postopek št. 91



Predvidena uporaba

Kompleta naftol AS-D kloroacetat esteraza Sigma-Aldrich in α -naftil acetat esteraza sta namenjena splošni laboratorijski uporabi za histološko barvanje. Reagenti za naftol AS-D kloroacetat esterazo in α -naftil acetat esterazo so namenjeni samo za profesionalno »diagnostično uporabo in vitro«. Ta ročni, kvalitativni, histokemični postopek dokazuje aktivnost naftol AS-D kloroacetat esteraze in α -naftil acetat esteraze v levkocitih človeške krvi, filmih kostnega mozga ali tipalnih preparatih tkiva. Histološka vizualizacija levkocitnih celičnih esteraz je edinstvena tehnika, ki se trenutno pogosto uporablja v medicini.

Celične esteraze so vseprisotne in očitno predstavljajo vrsto različnih encimov, ki delujejo na izbrane substrate. Pod določenimi reakcijskimi pogoji je mogoče določiti vrste hemopetskih celic z uporabo specifičnih esteraznih substratov. Opisane metode omogočajo hematologom in hematopatologom razlikovanje med granulociti in monociti.¹⁻⁷

Za izvedbo testa se pripravki krvi, filma kostnega mozga ali tipalni preparati tkiva inkubirajo z naftol AS-D kloroacetatom (NCAE) ali α -naftil acetatom (NAE) v prisotnosti sveže oblikovane diazonijeve soli. Pri encimski hidrolizi estrskih vezi se sproščajo proste naftolne spojine. Te se povežejo z diazonijevo soljo in tvorijo močno obarvane usedline na mestih encimske aktivnosti.

Najnovejši postopki, vključno s tistimi, ki jih ponuja Sigma-Aldrich, uporabljajo stabilne diazonijeve soli. Te nastanejo z reakcijo arilamina z natrijevim nitritom v kislem mediju.⁸ Nastali diazonijev klorid (običajno nestabilen) se lahko nato obdela s spojinami, kot so cinkov klorid, cinkov sulfat ali naftalen-1-6-disulfonat, pri čemer nastanejo stabilne soli. Ti stabilizatorji lahko izrazito zavirajo nekatere encimske sisteme, medtem ko diazonijevi kloridi zavirajo v manjši meri.⁸ Zato Sigma-Aldrich zdaj ponuja stabilne raztopine za Fast Red Violet LB Base, Fast Blue BB in natrijev nitrit za esterazno citokemijo. Za dodatno poenostavitev teh metod so vključene stabilne raztopine naftola AS-D kloroacetata in α -naftil acetata. Razpoložljivost teh stabilnih raztopin stranki omogoča, da prilagodi količino delovnega reagenta glede na potrebe, kar odpravlja odpadke.

Reagenti

Raztopina naftol AS-D kloroacetata (kat. št. 911-10ML)

Naftol AS-D kloroacetat, 8 mg/ml, in stabilizator. Opozorilo. Povzroča draženje oči. PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

Osnovna raztopina Fast Red Violet LB Base (kat. št. 912-10ML)

Osnovna raztopina Fast red violet LB Base, 15 mg/ml, v 0,4 mol/l klorovodikove kisline s stabilizatorjem. Nevarno. Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Koncentrat TRIZMAL™ 6.3 (kat. št. 913-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/l, s tenzidom. pH 6,3 ± 0,15 pri 25 °C. Nevarno. Povzroča draženje kože. Lahko povzroči alergijski odziv kože. Povzroča hude poškodbe oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Raztopina natrijevega nitrita (kat. št. 914-10ML)

Natrijev nitrit, 0,1 mol/l

Raztopina citrata (kat. št. 915-50ML)

Citronska kislina, 18 mmol/l, natrijev citrat, 9 mmol/l, natrijev klorid, 12 mmol/l, s tenzidom. pH 3,6 ± 0,1 pri 25 °C

Raztopina α -naftil acetata (kat. št. 916-10ML)

α -naftil acetat, 12,5 mg/ml, v raztopini metanola s stabilizatorji. Nevarno. Vnetljiva tekočina in hlapi. Strupeno pri zaužitju. Zdravju škodljivo in stiku s kožo ali pri vdihavanju. Povzroča blago draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Škodljivo za vodne organizme.

Osnovna raztopina Fast Blue BB (kat. št. 917-10ML)

Osnovna raztopina Fast blue BB Base, 15 mg/ml, C.I. 37175 v 0,4 mol/l klorovodikove kisline s stabilizatorji. Opozorilo. Zdravju škodljivo pri zaužitju. Povzroča blago draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav.

Koncentrat TRIZMAL™ 7.6 (kat. št. 918-50ML)

TRIZMA® maleat, 1 mol/l, s tenzidom. pH 7,6 ± 0,15 pri 25 °C. Nevarno. Povzroča draženje kože. Povzroča hude poškodbe oči. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Lahko povzroči draženje dihalnih poti. Škodljivo za vodne organizme.

Hematoksilinska raztopina Gill št. 3 (kat. št. GHS3-50ML)

Certificirani hematoksilin, 6,0 g/l, C.I. 75290, natrijev jodat, 0,6 g/l, in aluminijev sulfat, 52,8 g/l, s stabilizatorji. Nevarno. Zdravju škodljivo pri zaužitju. Povzroča hude poškodbe oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Raztopina natrijevega fluorida (kat. št. 919-25ML)

Natrijev fluorid, 20 g/l. Opozorilo. Zdravju škodljivo pri zaužitju. Povzroča blago draženje kože.

Posebni materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi

- Aceton, reagent ACS
- Formaldehid, 37 %, ACS
- Raztopina natrijevega fluorida, kat. št. 919-25ML (potrebna za postopek inhibicije α -naftil acetat esteraze s fluoridom).

Shranjevanje in stabilnost

Hematoksilinsko raztopino Gill št. 3 hranite pri sobni temperaturi (18–26 °C), zaščiten pred svetlobo. Druge reagentne hranite v hladilniku (2–8 °C).

Koncentrat TRIZMAL™ 6.3, koncentrat TRIZMAL™ 7.6 in citratna raztopina so primerni za uporabo v odstopnosti mikrobne rasti. Drugi reagenti so stabilni do izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznakah.

Poslabšanje kakovosti

Koncentrat TRIZMAL™ in citratna raztopina zavrzite, če je vidna mikrobna rast. Če raztopina postane rjava (preveč oksidirana zaradi zraka) ali vijolična (izguba kislosti), raztopino hematoksilina Gill št. 3 zavrzite.

Priprava

Pred uporabo vse reagentne segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C). Esterazni reagenti so ob dobavi pripravljeni za uporabo.

Citratno-acetonsko-formaldehidni fiksativ: 25 ml citratne raztopine dodajte 65 ml acetona in 8 ml 37-odstotnega formaldehida. Preljite v steklenico in jo trdno zaprite. Hranite v hladilniku (2–8 °C). Pred uporabo segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C). Obstočnost do 4 tedne, če je hranjeno trdno zaprto v hladilniku.

Previdnostni ukrepi

Izdelki IVD, ki so vključeni v te complete, so namenjeni za diagnostično uporabo in vitro v kliničnem laboratoriju. Ti izdelki IVD so namenjeni le strokovni uporabi s strani usposobljenega osebja. Z napravami Sigma-Aldrich IVD lahko upravlja laboratorijsko osebje, ki je usposobljeno za ravnanje s človeškimi vzorci, ki so lahko kužni, za uporabo mikroskopov in druge laboratorijske opreme ter ima sposobnost zaznavanja barv in ostrino vida za razlikovanje barv in drugih predmetov pod mikroskopom.

Upoštevati je treba običajne previdnostne ukrepe pri ravnanju z laboratorijskimi reagenti. Odpadke odstranite v skladu z vsemi lokalnimi, državnimi, pokrajinskimi ali nacionalnimi predpisi.

Postopek

Zbiranje vzorcev

Nobena znana testna metoda ne more dati popolnega zagotovila, da vzorci krvi ali tkiva ne bodo prenesli okužbe. Zato je treba vse krvne derivate ali tkivne vzorce obravnavati kot potencialno kužne.

Kri, filme kostnega mozga, tipalne preparate tkiva in preparate iz citocentrifug se lahko uporablja tako z α -naftil acetat esterazo kot z naftol AS-D kloroacetat esterazo. EDTA ali heparin bosta služila kot antikoagulant.⁹ Zamrznjena in v parafin vklopljena tkiva se lahko uporabljajo z naftol AS-D kloroacetat esterazo. α -naftil acetat esteraza se lahko uspešno uporablja na zamrznjenih tkivnih rezinah.¹⁰ Filmi krvi ali kostnega mozga se lahko hranijo fiksirani pri sobni temperaturi (18–26 °C) več tednov ali nefiksirani več dni brez opazne spremembe aktivnosti.^{4,9} Polne krvi ne pošiljajte za analizo v druge laboratorije. Pošljite fiksirane ali nefiksirane stekelca. Stekelca je treba med prevozom hraniti na hladnem. Pred fiksacijo pustite filme, da se sušijo vsaj 1 uro.

Omejitve postopka

Opisani postopki se izvajajo pri 37 °C. Če reagenti niso segreti na to temperaturo, lahko pride do šibkih ali negativnih reakcij. Priporočljivo je, da temperaturo preverite z natančnim termometrom. Vodne kopeli z nadzorovano temperaturo so učinkovitejše od inkubatorjev s toplim zrakom in jih je treba uporabljati za encimske citokemične metode. Prenos toplote skozi steklo je hitrejši kot skozi plastiko, zato je treba uporabljati steklene kozarce Coplin.

Številni encimski sistemi so občutljivi na majhne sledi detergenta. Umivanje steklene posode z razredčenim belilom, ki mu sledi izpiranje v velikih količinah deionizirane vode, bo preprečilo učinek detergenta na celične encime.

Sistem za fiksiranje, opisan v razdelku »Reagenti«, vsebuje formaldehid. Če fiksativ ni popolnoma odstranjen z močnim izpiranjem, lahko vsaka količina aldehida, bodisi koncentrirana na zračno posušenih stekelcih bodisi v sledovih na mokrih stekelcih, dodana v inkubacijski sistem, povzroči inhibicijo encima. Usmerite tok vode na stekelce nad robom, pridobljenim s tehniko klistastega potiska. Tako boste preprečili izgubo krvnega filma med postopkom izpiranja. Izperite obe strani stekelca.

Rezultati temeljijo na določeni stopnji subjektivne razlage. Posamezni laboratoriji morajo določiti lastna normalna območja.

Opombe

Uporabniki kompletov Sigma 390A in 91C morajo biti previdni pri uporabi pufrskih koncentratov TRIZMA® kat. št. 913 in 903C, saj niso medsebojno zamenljivi. Uporaba nepravilnega pufra bo povzročila negativno reakcijo.

Postopek

Opisani postopki se izvajajo pri 37 °C.

Naftanol AS-D kloroacetat esterazni postopek

- Zadostno količino deionizirane vode za uporabo substrata vnaprej segrejte na 37 °C. Pred uporabo preverite temperaturo.
- Neposredno pred fiksacijo dodajte 1 ml raztopine natrijevega nitrita v 1 ml osnovne raztopine Fast Red Violet LB Base v testno epruveto. Nežno premešajte z obračanjem in pustite stati 2 minuti. Izogibati se je treba aktivnemu nastajanju plinskih mehurčkov.
- Raztopino iz koraka 2 dodajte 40 ml predhodno ogrete deionizirane vode iz koraka 1.
- Dodajte 5 ml koncentrata pufra TRIZMAL™ 6.3. (glejte »Opomba«)
- Dodajte 1 ml raztopine naftol AS-D kloroacetata. Raztopina bi morala postati rdeča. Dobro premešajte in vlijte v kozarec Coplin.
- Raztopino citrata, acetona in formaldehida (CAF) segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C). Stekelca fiksirajte tako, da jih za 30 sekund potopite v raztopino CAF.
- Stekelca 45–60 sekund temeljito spirajte v tekoči deionizirani vodi, nato jih položite v raztopino iz koraka 5. Ne dovolite, da se stekelca posušijo.
- Inkubirajte 15 minut pri 37 °C, zaščiten pred svetlobo.
- Po 15 minutah odstranite stekelca in jih vsaj 2 minuti temeljito spirajte v deionizirani vodi.
- Kontrastno barvajte 2 minuti v raztopini hematoksilina, Gill št. 3.
- Izperite z vodo iz pipe in posušite na zraku.
- Ocenite mikroskopsko. Če je potrebno prekrivanje, uporabite samo vodni medij za pritrdjevanje.

Opombe

- Za uporabo s kozarci Columbia delite volumne reagentov s 5.
- Če je substrat (glejte 5. korak) moten, ga segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C) in dobro premešajte.
- Če so bili preparati predhodno fiksirani in shranjeni, preskočite fiksacijo (koraka 6 in 7) in začnite barvanje suhih, predhodno fiksiranih preparatov v koraku 8.

Postopek z α-naftil acetat esterazo

1. Zadostno količino deionizirane vode za uporabo substrata vnaprej segrejte na 37 °C. Pred uporabo preverite temperaturo.
2. Neposredno pred fiksacijo dodajte 1 ml raztopine natrijevega nitrita v 1 ml osnovne raztopine Fast Blue BB v epruveto. Zmešajte z obračanjem in pustite stati vsaj 2 minuti. Barva se bo spremenila iz umazano rjave v temno rumeno. Izogibati se je treba aktivnemu nastajanju plinskih mehurčkov.
3. Raztopino iz koraka 2 dodajte 40 ml predhodno ogrete deionizirane vode iz koraka 1.
4. Dodajte 5 ml koncentrata pufra TRIZMAL™ 7.6.
5. Dodajte 1 ml raztopine α-naftil acetata. Raztopina bi morala postati zelenkasta. Dobro premešajte in vlijte v kozarec Coplin.
6. Raztopino citrata, acetona in formaldehida (CAF) segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C). Stekelca fiksirajte tako, da jih za 30 sekund potopite v raztopino CAF. Zadnjih 5 sekund močno mešajte preparate.
7. Stekelca 45–60 sekund temeljito spirajte v tekoči deionizirani vodi, nato jih položite v raztopino iz koraka 5. Ne dovolite, da se stekelca posušijo.
8. Inkubirajte 30 minut pri 37 °C, zaščiteno pred svetlobo.
9. Po 30 minutah odstranite stekelca in jih vsaj 2 minuti temeljito izpirajte v tekoči deionizirani vodi.
10. Kontrastno barvajte 2 minuti v raztopini hematoksilina, Gill št. 3.
11. Izperite z vodo iz pipe in posušite na zraku.
12. Ocenite mikroskopsko. Če je potrebno prekrivanje, uporabite samo vodni medij za pritrdjevanje.

Opombe

- Za uporabo s kozarci Columbia delite volumne reagentov s 5.
- Če je substrat (glejte 5. korak) moten, ga segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C) in dobro premešajte.
- Če so bili preparati predhodno fiksirani in shranjeni, preskočite fiksacijo (koraka 6 in 7) in začnite barvanje suhih, predhodno fiksiranih preparatov v koraku 8.

Postopek dvojnega barvanja z esterazo

1. Izvedite test α-naftil acetat estraze, kot je opisano v razdelku s postopkom. Ne uporabljajte kontrastnih barvil.
2. 5 minut izpirajte v deionizirani vodi.
3. Izvedite preskus naftol AS-D kloroacetatne estraze, kot je opisano v korakih postopka 1–12. Izpustite korak 6.

Opomba

Osnovna raztopina Fast Blue BB se lahko nadomesti z osnovno raztopino Fast Red Violet LB, če je za naftol AS-D kloroacetatno esterazo zaželena modra granulacija.

Postopek inhibicije α-naftil acetat esteraze s fluoridom

Čeprav je α-naftil acetat esterazo mogoče najti predvsem v celicah monocitne linije, ko se izvaja, kot je opisano, je treba priznati, da so megakariociti in eritroidni prekurzorji pozitivni na ta encim.¹¹ Limfociti in nekateri zreli granulociti so prav tako občasno pozitivni.⁴ Za dokončno razlikovanje teh celic od monocitov se v inkubacijski sistem doda natrijev fluorid. V prisotnosti te spojine se encim monocitov inaktivira.¹² Za izvedbo testa inhibicije fluorida se lahko uporabi naslednji postopek.

1. K 2 ml osnovne raztopine Fast Blue BB dodajte 2 ml raztopine natrijevega nitrita. Nežno premešajte z obračanjem. Pustite stati 2 minuti.
2. Označite dve čaši A in B ter dodajte to:

	Čaša A	Čaša B
Predhodno ogreta deionizirana voda s temperaturo 37 °C	40 ml	40 ml
Diazotizirana raztopina Fast Blue BB iz koraka 1	2 ml	2 ml
Koncentrat TRIZMAL™ 7.6	5 ml	5 ml
Raztopina α-naftil acetata	1 ml	1 ml
Raztopina natrijevega fluorida	-	1 ml

3. Dobro premešajte in prelijte v kozarce Coplin z oznakama A in B.
4. Nadaljujte, kot je opisano v korakih 6–12 v postopku za esterazo α-naftil acetata.

Značilnosti delovanja

Način točkovanja

Preglejte film in izberite tanko področje z malo eritrociti. Mesta aktivnosti naftol AS-D kloroacetatne esteraze bodo videti kot svetlo rdeča zrnca, α-naftil acetatna esteraza pa kot črna zrnca. Ocenite od 0 do 4+ na podlagi količine in intenzivnosti posameznih barvil v citoplazmi ustreznih vrst celic. Značilnosti točkovanja temeljijo na nekoliko subjektivni razlagi. Predlagana oblika točkovanja je predstavljena v tabeli 1. Sklepi so odvisni od relativne prisotnosti ali odsotnosti obarvanosti.

Tabela 1. Značilnosti točkovanja

Ocena celic	Intenzivnost obarvanja	Razlaga
0+	Brez	–
1+	Šibko do zmerno	±
2+	Zmerno do močno	+
3+	Močno	+
4+	Briljantno	+

Pričakovana opažanja

Naftol AS-D kloroacetatna esteraza

(Fast Red Violet LB) – encim običajno velja za specifičnega za celice granulocitne linije. Na mestih delovanja je vidna svetlo rdeča granulacija. V monocitih in limfocitih je aktivnost šibka ali je ni.

α-naftil acetat esteraza

(Fast Blue BB) – encim je zaznan predvsem v monocitih, makrofagih in histiocitih, v granulocitih pa ga praktično ni. Monociti bi morali imeti črno granulacijo. Limfociti lahko občasno kažejo encimsko aktivnost.

Esteraza z dvojnim obarvanjem

Vzorci, odvzeti s postopkom dvojnega obarvanja, pokažejo granulocite z rdečo granulacijo in monocite s črno granulacijo.

Esteraza α-naftil acetata z inhibicijo s fluoridom

Vse celice monocitne linije bodo negativne na encimsko aktivnost, razen diferenciranih histiocitov ali specializiranih makrofagov v tkivu, ki so lahko odporni tudi proti natrijevemu fluoridu.¹⁰

Nadzor kakovosti

Sistem reagentov je treba spremljati z uporabo pozitivnih in negativnih kontrolnih stekelc.

Pozitivna kontrolna stekelca se lahko pripravijo iz določenih celičnih linij, za katere je znano, da so pozitivne.

Uporabiti je mogoče tudi antikoagulirano kri iz normalnih vzorcev (po možnosti s povečanim številom monocitov, če se uporablja postopek z α-naftil acetat esterazo); vendar se bo obarvala manj intenzivno in bo imela manj pozitivnih celic.

Kot negativna kontrola se lahko uporabijo stekelca znano negativnih bolnikov. Če vzorec ni na voljo, bo obarvanje vzorca v inkubacijski mešanici z izpuščenim substratom dalo zelene rezultate. Vendar pa je zelo priporočljiva uporaba prvega.

Če opaženi rezultati odstopajo od pričakovanih, se za pomoč obrnite na oddelek za tehnično pomoč podjetja Sigma-Aldrich.

Značilnosti analitične učinkovitosti

Rezultati analitične učinkovitosti za dane teste, opravljene na vseh ciljnih strukturah, potrjujejo 100-odstotno občutljivost, specifičnost in ponovljivost.

Kat. št.	Opis izdelka	Cilj	Specifičnost znotraj testa	Občutljivost znotraj testa	Specifičnost med testi	Občutljivost med testi
911	Raztopina naftol AS-D kloroacetata	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
912	Osnovna raztopina Fast Red Violet LB	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
913	Koncentrat TRIZMAL™ 6.3	Osmolalnost	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
		pH	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
914	Raztopina natrijevega nitrita	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
915	Raztopina citrata	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
916	Raztopina α-naftil acetata	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
917	Osnovna raztopina Fast Blue BB	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
918	Koncentrat TRIZMAL™ 7.6	Osmolalnost	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
		pH	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
919	Raztopina natrijevega fluorida	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
GHS3	Raztopina hematoksilina, Gill št. 3	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3

Opozorila in nevarnosti

Vse posodobljene informacije o tveganju, nevarnosti ali varnosti najdete na varnostnem listu in oznaki izdelka.

91A:



H226 Vnetljiva tekočina in hlapi.

H290 Lahko je jedko za kovine.

H301 Strupeno pri zaužitju.

H312 + H332 Zdravju škodljivo v stiku s kožo ali pri vdihavanju.

H319 Povzroča hudo draženje oči.

H370 Škoduje organom (oči, osrednje živčevje).

H412 Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki.

P210 Hraniti ločeno od vročine, vročih površin, isker, odprtega ognja in drugih virov vžiga. Kajenje je prepovedano.

P273 Preprečiti sproščanje v okolje.

P280 Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščitno za oči/zaščitno za obraz.

P301 + P310 PRI ZAUŽITJU: Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.

P303 + P361 + P353 PRI STIKU S KOŽO (ali lasmi): Takoj sleči vsa kontaminirana oblačila. Kožo izprati z vodo.

P304 + P340 + P312 PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/ZDRAVNIKA.

91C:



- H290 Lahko je jedko za kovine.
- H302 Zdravju škodljivo pri zaužitju.
- H315 Povzroča draženje kože.
- H317 Lahko povzroči alergijski odziv kože.
- H318 Povzroča hude poškodbe oči.
- H335 Lahko povzroči draženje dihalnih poti.
- 360FD Lahko škoduje plodnosti. Lahko škoduje nerojenemu otroku.
- H373 Pri dolgotrajni ali ponavljajoči se izpostavljenosti lahko ob zaužitju povzroči poškodbe organov (ledvice).
- P202 Ne uporabljajte, dokler se ne seznanite z vsemi varnostnimi ukrepi.
- P280 Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz.
- P301 + P312 PRI ZAUŽITJU: Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/ZDRAVNIKA.
- P302 + P352 PRI STIKU S KOŽO: Umiti z veliko vode.
- P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.
- P308 + P313 PRI izpostavljenosti ali sumu izpostavljenosti: Poišcite zdravniško pomoč/oskrbo.

Če je med uporabo te naprave ali kot posledica njene uporabe prišlo do resnega incidenta, o tem obvestite proizvajalca in/ali njegovega pooblaščenega zastopnika ter ustrezen državni organ.

Definicije simbolov

Simboli, kot so opredeljeni v standardu EN ISO 15223-1:2021

	Proizvajalec		Kataloška številka
	Natančno preberite navodila za uporabo		Koda serije
	Pooblaščen zastopnik v Evropski skupnosti/Evropski uniji		Izjava Evropske unije o skladnosti (opredeljena v IVDR 2017/746)
	Rok uporabe		Medicinski diagnostični pripomoček in vitro
	Temperaturna omejitev		Pozor
	Datum izdelave		Uvoznik
	Označuje pooblaščenega zastopnika v Švici		

Reference

1. Beckmann J, Neth R, Gaedick G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. Haematol Bluttransfus 14:26, 1974
2. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells 1:101, 1975
3. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clinics in Haematol 1:49, 1972
4. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 55:283, 1971
5. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. Arch Pathol 97: 129, 1974
6. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. J Natl Cancer Inst 18:167, 1957
7. Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
8. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
9. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: In Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

Kontaktni podatki

Če želite oddati naročilo, obiščite naše spletno mesto [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Če želite tehnično pomoč, obiščite stran tehničnega servisa na našem spletnem mestu [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Zgodovina revizij

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Preneseno v novo predlogo s trenutno blagovno znamko. Navedeno za poklicno uporabo v okviru predvidene uporabe in previdnostnih ukrepov. Revidiran je namen uporabe za uskladiitev s smernicami IVDR. Posodobljen je varnostni list materiala v varnostni list. Posodobljeni so kontaktni podatki. Odstranjeno je navodilo, da je treba pri zbiranju vzorcev upoštevati standard CLSI. Odstranjen je standard EN 980 in za simbole spremenjen v standard EN ISO 15223-1:2021. Dodani so kontaktni podatki v primeru neželenih dogodkov. Posodobljeni so viri literature. Dodana je preglednica zgodovine revizij. Dodana so opozorila in nevarnosti. Dodane so bile informacije o zastopniku v Švici.	

	Sigma-Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany +1(314) 771-5765		MDSS GmbH Schiffgraben 41 30175 Hannover, Germany		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
	MDSS CH GmbH Laurenzenvordstadt 61 5000 Aarau Switzerland				