

Instructions for Use

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

Procedure No. 90



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 leukocyte cellular esterases is a unique technique currently commonly used in medicine.

Cellular esterases are ubiquitous and appear to represent 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 means to distinguish granulocytes from monocytes.¹⁻⁸

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

Reagents

Dimethyl Formamide (Cat. No. 9010-25ML)

Dimethyl formamide, 100% Danger. Flammable liquid and vapour. May be harmful if swallowed. Harmful in contact with skin. Causes mild skin irritation. Causes serious eye irritation. Toxic if inhaled. May damage the unborn child. Obtain special instructions before use.

Ethylene Glycol Monomethyl Ether (Cat. No. 9011-25ML)

2-MethoxyEthanol, 100% Danger. Flammable liquid and vapour. May be harmful if swallowed. Harmful in contact with skin. Causes mild skin irritation. Causes serious eye irritation. Toxic if inhaled. May damage fertility or the unborn child. Obtain special instructions before use.

Naphthol AS-D Chloroacetate (Cat. No. 905-10CAP)

Naphthol AS-D Chloroacetate, 20 mg/cap.

α -Naphthyl Acetate (Cat. No. 906-10CAP)

Naphthol AS-D Chloroacetate, 20 mg/cap Danger. Causes serious eye damage. Wear protective gloves/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate (Cat. No. 903C-50ML)

TRIZMA® maleate, 200 mmol/L, Chloroform added as preservative

TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate (Cat. No. 902C-50ML)

TRIZMA® maleate, 200 mmol/L, Chloroform added as preservative

Mayer's Hematoxylin Solution (Cat. No. MHS1-100ML)

Hematoxylin, certified, CI 75290, 0.1% (w/v), and stabilizers

Acid Hematoxylin Solution (Cat. No. 2852-100ML)

Hematoxylin certified, CI 75290, 1 g/L, and stabilizers, pH 3.3 at 25°C

Fast Blue RR Salt (Cat. No. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Preweighed capsules. Actual weight per capsule will vary with dye lot purity and has been optimized by assay.

Fast Corinth V Salt (Cat. No. 9015-10CAP)

Fast Corinth V Salt, 18-22 mg/cap. Danger. Harmful if swallowed. Harmful in contact with skin. Harmful if inhaled. May cause cancer. Obtain special instructions before use. Wear protective gloves/protective clothing.

Citrate Concentrate (Cat. No. 3861-20ML)

Citrate buffer, 0.38 mol/L, pH 5.4 when diluted according to procedure

Special Materials Required but Not Provided

- Methanol, Absolute
- Acetone, ACS Reagent
- Sodium Fluoride Solution (Cat. No. 919-25ML) Sodium fluoride, 2 g/dL

Storage and Stability

Dimethyl Formamide, Ethylene Glycol Monomethyl Ether, TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate, TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate, Mayer's Hematoxylin Solution and Acid Hematoxylin Solution, are stored at room temperature (18–26°C).

Naphthol AS-D Chloroacetate, α -Naphthyl Acetate and Fast Blue RR Salt are stored below 0°C.

Fast Corinth V Salt and Citrate Concentrate are stored refrigerated (2–8°C).

Naphthol AS-D Chloroacetate, α -Naphthyl Acetate, Fast Blue RR Salt and Fast Corinth V Salt are stable until the expiration date shown on the labels.

Citrate Dilute Solution is stable for 1 week if stored tightly capped at room temperature (18–26°C).

TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate, TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate and Citrate Concentrate are suitable for use in the absence of microbial growth.

Sodium fluoride, 2 g/dL. Store at room temperature (18–26°C). Used if " α -Naphthyl Acetate Esterase with Fluoride Inhibition Procedure" is performed.

Deterioration

Discard Dimethyl Formamide and Ethylene Glycol Monomethyl Ether if colored or turbid.

TRIZMAL™ 6.3 Dilute Buffer Solution and TRIZMAL™ 7.6 Dilute Buffer Solution should be used once then discarded.

Discard Mayer's Hematoxylin and Acid Hematoxylin Solution when the time required for suitable staining exceeds the time recommended in the procedure by more than 5 minutes.

Preparation

Naphthol AS-D Chloroacetate Solution is prepared by dissolving contents of 1 capsule Naphthol AS-D Chloroacetate in 2 mL Dimethyl Formamide. Remove 1 capsule from freezer as needed. Prepare immediately prior to use.

α -Naphthyl Acetate Solution is prepared by dissolving contents of 1 capsule α -Naphthyl Acetate in 2 mL Ethylene Glycol Monomethyl Ether. Remove 1 capsule from freezer as needed. Prepare immediately prior to use.

TRIZMAL™ 6.3 Dilute Buffer Solution is prepared by diluting 1 part TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate with 9 parts deionized water. The pH should be 6.3 at 25°C.

TRIZMAL™ 7.6 Dilute Buffer Solution is prepared by diluting 1 part TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate with 9 parts deionized water. The pH should be 7.6 at 25°C.

Mayer's Hematoxylin and Acid Hematoxylin Solution should be filtered before use.

Citrate Dilute Solution is prepared by diluting 1 part Citrate Concentrate with 9 parts deionized water. pH 5.4 when diluted.

Citrate-Acetone-Methanol Fixative: To 18 mL Citrate Dilute Solution, add 27 mL ACS grade Acetone and 5 mL Methanol. Store tightly capped at room temperature (18–26°C). Discard after 8 hours.

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 preparations, 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.^{5,9} 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.

Notes

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.

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

Procedures

Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase Procedure

1. Fix slides for 1 minute in Citrate-Acetone-Methanol Fixative at room temperature (18–26°C).
2. Wash thoroughly in deionized water and air dry at least 20 minutes.
3. To 50 mL TRIZMAL™ 6.3 Dilute Buffer Solution, PREWARMED TO 37°C, add with constant stirring, contents of 1 capsule Fast Corinth V Salt.
4. When salt is completely dissolved in buffer, add 2 mL Naphthol AS-D Chloroacetate Solution. The solution will appear quite turbid.
5. Continue mixing for 15–30 seconds, then add to Coplin jar. DO NOT FILTER.
6. Place specimens in staining solution (from Step 5) and incubate at 37°C for 5 minutes. NOTE: PROTECT FROM LIGHT.
7. Remove slides from stain and wash in deionized water for 3 minutes. Discard staining solution.
8. If desired, counterstain in Acid Hematoxylin Solution for 5–10 minutes and wash in tap water.
9. Air dry slides and examine microscopically. If coverslipping is required use only an aqueous mounting media.

α -Naphthyl Acetate Esterase Procedure

1. Fix slides in Citrate-Acetone-Methanol Fixative for 1 minute at room temperature (18–26°C).
2. Wash thoroughly in deionized water and air dry at least 20 minutes.
3. To 50 mL TRIZMAL™ 7.6 Dilute Buffer Solution, PREWARMED TO 37°C, add with constant stirring, contents of 1 capsule Fast Blue RR Salt.
4. When salt is completely dissolved in buffer, add 2 mL α -Naphthyl Acetate Solution. The solution will be yellow and slightly turbid.
5. Continue stirring for 15–20 seconds, then add to Coplin jar. DO NOT FILTER.
6. Place specimens in staining solution (from Step 5) and incubate at 37°C for 30 minutes. NOTE: PROTECT FROM LIGHT.
7. Remove slides from stain and wash for 3 minutes in deionized water. Discard staining solution.
8. If desired, counterstain for 5–10 minutes in Mayer's Hematoxylin Solution, and wash in tap water.
9. Air dry slides and examine microscopically. If coverslipping is required use only an aqueous mounting media.

Double Staining Esterase Procedure

- 1. Perform α-Naphthyl Acetate Esterase test as described in Procedure. Do not counterstain.
- 2. Rinse slides 5 minutes in deionized water.
- 3. Perform Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase test as described in procedure Steps 3-9.

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.⁵ 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. Fix slides in Citrate-Acetone-Methanol Fixative for 1 minute at room temperature (18–26°C).
- 2. Wash thoroughly in deionized water and air dry at least 20 minutes.
- 3. Label 2 beakers A and B, and add the following:

	Beaker A	Beaker B
Prewarmed 37°C TRIZMAL™ 7.6 Dilute Buffer	50 mL	50 mL
Add with constant stirring, Fast Blue RR	1 capsule*	1 capsule*
α-Naphthyl Acetate Solution	2 mL	2 mL
Sodium Fluoride Solution	-	2 mL

*Contents of 1 capsule

- 4. Mix well and pour into Coplin jars labeled A and B.
- 5. Proceed as described in Steps 6–9 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 somewhat on 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	+

Results

Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase

This enzyme is usually considered specific for cells of granulocytic lineage. The cells should show red granulation. Activity is weak or absent in monocytes and lymphocytes.

α-Naphthyl Acetate Esterase

Under the assay conditions (pH 7.6), this enzyme is detected primarily in monocytes, macrophages and histiocytes, and is virtually absent in granulocytes. Monocytes should show black granulation. Lymphocytes may occasionally exhibit activity.

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

Double Staining Esterase

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

The expected cellular reactivity of tests for esterase activity is summarized in Table II.

Table II. Cytochemical Reactions of Blood Cells

Cell Type	Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase	α-Naphthyl Acetate Esterase
Myeloblasts	±	±
Promyelocytes	+	±
Neutrophils	+	—
Eosinophils	—	—
Basophils	±	—
Monocytes	—	+
Lymphocytes	—	±
Lymphoblasts	—	±
Megakaryocytes	—	+
Erythroblasts	—	±
Plasma Cells	—	±
Mast Cells	+	—
Hairy Cells	—	±
Histiocytes	±	+

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
9010	Dimethyl Formamide	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
9011	Ethylene Glycol Monomethyl Ether	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
905	Naphthol AS-D Chloroacetate	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
906	α-Naphthyl Acetate	Identity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
903C	TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
902C	TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
MHS1	Mayers Hematoxylin Solution	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
2852	Acid Hematoxylin Solution	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
FBS25	Fast Blue RR Salt	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
9015	Fast Corinth V Salt	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
3861	Citrate Concentrate	Sites of Activity	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Toxic if swallowed, in contact with skin or if inhaled.

H315 Causes skin irritation.

H317 May cause an allergic skin reaction.

H318 Causes serious eye damage.

H341 Suspected of causing genetic defects.

H350 May cause cancer.

H410 Very toxic to aquatic life with long lasting effects.

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.

P302 + P352 + P312 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. Call a POISON CENTER/ doctor if you feel unwell.

P304 + P340 + P311 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER/ doctor.

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Contact Information

To place an order, please visit our web site at [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). For Technical Service, please visit the tech service page on our web site at [SigmaAldrich.com/techservice](https://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. Moved aid to diagnosis statement to intended use. 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. 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 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. 90



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-Chloracetatesterase- und α -Naphthylacetatesterase-Reagenzien sind nur für die professionelle „In-vitro-Diagnostik“ bestimmt. Dieses manuelle, qualitative, histochemische Verfahren weist die Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase- und α -Naphthylacetatesterase-Aktivität in Leukozyten aus menschlichem Blut, Knochenmarkausstrichen oder Gewebepfpräparaten nach. Die histologische Visualisierung der zellulären Esterasen von Leukozyten ist eine einzigartige Technik, die derzeit in der Medizin häufig eingesetzt wird.

Zelluläre Esterasen finden sich ubiquitär und scheinen eine Reihe verschiedener Enzyme zu repräsentieren, die mit bestimmten Substraten interagieren. Unter definierten Reaktionsbedingungen ist es möglich, mit spezifischen Esterase-Substraten hämatopoetische Zelltypen zu bestimmen. Die beschriebenen Methoden ermöglichen die Unterscheidung zwischen Granulozyten und Monozyten.¹⁻⁸

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

Reagenzien

Dimethylformamid (Kat.-Nr. 9010-25ML)

Dimethylformamid, 100 % Gefahr. Entzündliche Flüssigkeit und Dampf. Kann beim Verschlucken schädigend sein. Gesundheitsschädlich bei Kontakt mit der Haut. Verursacht leichte Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizungen. Giftig beim Einatmen. Kann das ungeborene Kind schädigen. Informieren Sie sich über besondere Hinweise zur Verwendung.

Ethylenglykolmonomethylether (Kat.-Nr. 9011-25ML)

2-Methoxyethanol, 100 % Gefahr. Entzündliche Flüssigkeit und Dampf. Kann beim Verschlucken schädigend sein. Gesundheitsschädlich bei Kontakt mit der Haut. Verursacht leichte Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizungen. Giftig beim Einatmen. Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen und das ungeborene Kind schädigen. Informieren Sie sich über besondere Hinweise zur Verwendung.

Naphthol-AS-D-Chloracetat (Kat.-Nr. 905-10CAP)

Naphthol-AS-D-Chloracetat, 20 mg/Kapsel

α -Naphthylacetat (Kat.-Nr. 906-10CAP)

Naphthol-AS-D-Chloracetat, 20 mg/Kapsel Gefahr. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. WENN IM AUGE: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.

TRIZMAL™ 6.3 Pufferkonzentrat (Kat.-Nr. 903C-50ML)

TRIZMA® Maleat, 200 mmol/l. Chloroform als Konservierungsmittel zugesetzt

TRIZMAL™ 7.6 Pufferkonzentrat (Kat.-Nr. 902C-50ML)

TRIZMA® Maleat, 200 mmol/l. Chloroform als Konservierungsmittel zugesetzt

Mayer-Hämatoxylin-Lösung (Kat.-Nr. MHS1-100ML)

Hämatoxylin, zertifiziert, CI 75290, 0,1 % (w/v) und Stabilisatoren

Saure Hämatoxylin-Lösung (Kat.-Nr. 2852-100ML)

Hämatoxylin zertifiziert, CI 75290, 1 g/l, und Stabilisatoren, pH-Wert 3,3 bei 25 °C

Echtblausalz RR (Kat.-Nr. FBS25-10CAP)

Echtblau, C.I. 37155. Vorgewogene Kapseln. Das tatsächliche Gewicht pro Kapsel hängt von der Reinheit der Farbstoffcharge ab und wurde anhand von Assays optimiert.

Echtkorinthsalz V (Kat.-Nr. 9015-10CAP)

Echtkorinthsalz V, 18–22 mg/Kapsel. Gefahr. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Gesundheitsschädlich bei Kontakt mit der Haut. Gesundheitsschädlich beim Einatmen. Kann Krebs erzeugen. Informieren Sie sich über besondere Hinweise zur Verwendung. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen.

Citratkonzentrat (Kat.-Nr. 3861-20ML)

Citratpuffer, 0,38 mol/l, pH-Wert 5,4 bei einer Verdünnung gemäß dem Verfahren

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

- Ethanol, rein
- Aceton, ACS-Reagenz
- Natriumfluorid-Lösung (Kat.-Nr. 919-25ML) Natriumfluorid, 2 g/dl

Lagerung und Stabilität

Dimethylformamid, Ethylenglykolmonomethylether, TRIZMAL™ 6.3 Pufferkonzentrat, TRIZMAL™ 7.6 Pufferkonzentrat, Mayer-Hämatoxylin-Lösung und saure Hämatoxylin-Lösung sind bei Raumtemperatur (18–26 °C) zu lagern.

Naphthol-AS-D-Chloracetat, α -Naphthylacetat und Echtblausalz RR sind bei Temperaturen unter 0 °C zu lagern.

Echtkorinthsalz V und Citratkonzentrat sind im Kühlschrank (2–8 °C) zu lagern.

Naphthol-AS-D-Chloracetat, α -Naphthylacetat, Echtblausalz RR und Echtkorinthsalz V sind bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum stabil.

Verdünnte Citratlösung ist 1 Woche lang stabil, wenn sie dicht verschlossen bei Raumtemperatur (18–26 °C) gelagert wird.

TRIZMAL™ 6.3 Pufferkonzentrat, TRIZMAL™ 7.6 Pufferkonzentrat und Citratkonzentrat können bei Abwesenheit von mikrobiellem Wachstum verwendet werden.

Natriumfluorid, 2 g/dl. Bei Raumtemperatur (18–26 °C) lagern. Verwendet bei Durchführung der „ α -Naphthylacetatesterase-Verfahren mit Fluorid-Inhibition“.

Zerfall

Dimethylformamid und Ethylenglykolmonomethylether bei Verfärbung oder Trübung entsorgen.

Die verdünnte TRIZMAL™ 6.3 Pufferlösung und die verdünnte TRIZMAL™ 7.6 Pufferlösung sind nach einmaliger Verwendung zu entsorgen.

Die Mayer-Hämatoxylin-Lösung und die saure Hämatoxylin-Lösung müssen entsorgt werden, wenn die für eine angemessene Färbung benötigte Zeit die im Verfahren empfohlene Zeit um mehr als 5 Minuten überschreitet.

Vorbereitung

Zur Herstellung der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Lösung den Inhalt einer Kapsel Naphthol-AS-D-Chloracetat in 2 ml Dimethylformamid auflösen. Nach Bedarf 1 Kapsel aus dem Gefrierschrank nehmen. Unmittelbar vor dem Gebrauch zubereiten.

α -Naphthylacetat-Lösung wird durch Auflösen des Inhalts einer Kapsel α -Naphthylacetat in 2 ml Ethylenglykolmonomethylether hergestellt. Nach Bedarf 1 Kapsel aus dem Gefrierschrank nehmen. Unmittelbar vor dem Gebrauch zubereiten.

Die verdünnte TRIZMAL™ 6.3 Pufferlösung wird durch Verdünnen von 1 Teil TRIZMAL™ 6.3 Pufferkonzentrat mit 9 Teilen entionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert sollte bei 25 °C 6,3 betragen.

Die verdünnte TRIZMAL™ 7.6 Pufferlösung wird durch Verdünnen von 1 Teil TRIZMAL™ 7.6 Pufferkonzentrat mit 9 Teilen entionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert sollte bei 25 °C 7,6 betragen.

Mayer-Hämatoxylin-Lösung und saure Hämatoxylin-Lösung sollten vor der Verwendung filtriert werden.

Die verdünnte Citratlösung wird durch Verdünnen von 1 Teil Citratkonzentrat mit 9 Teilen entionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert beträgt nach Verdünnung 5,4.

Citrat-Aceton-Methanol-Fixiermittel: 18 ml verdünnte Citratlösung mit 27 ml Aceton (ACS-Qualität) und 5 ml Methanol versetzen. Fest verschlossen bei Raumtemperatur (18–26 °C) lagern. Nach 8 Stunden entsorgen.

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 Laborpersonal 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, Gewebepfpräparate und Zytocentrifugenpräparate können sowohl mit α -Naphthylacetatesterase als auch mit Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase verwendet werden. Als Antikoagulanzen werden EDTA und Heparin verwendet werden.⁹ Gefrorene und in Paraffin eingebettete Gewebe können mit Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase verwendet werden. α -Naphthylacetatesterase kann bei gefrorenen Gewebeschnitten 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.^{5,9} 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.

Anmerkungen

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 Warmluftinkubatoren 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.

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

Verfahren

Verfahren mit Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase

- Die Objektträger 1 Minute lang in Citrat-Aceton-Methanol-Fixiermittel bei Raumtemperatur (18–26 °C) fixieren.
- Gründlich in entionisiertem Wasser spülen und mindestens 20 Minuten an der Luft trocknen lassen.
- Zu 50 ml verdünnter TRIZMAL™ 6.3 Pufferlösung, auf 37 °C VORGEWÄRMT, unter ständigem Rühren den Inhalt von 1 Kapsel Echtkorinthsalz V hinzufügen.
- Nachdem das Salz vollständig im Puffer gelöst ist, 2 ml Naphthol-AS-D Chloracetat-Lösung hinzufügen. Die Lösung erscheint recht trübe.
- 15 bis 30 Sekunden weiter mischen und die Mischung dann in den Coplin-Färbetrog geben. NICHT FILTRIEREN.
- Die Proben in die Färbelösung (aus Schritt 5) legen und 5 Minuten bei 37 °C inkubieren. HINWEIS: VOR LICHT SCHÜTZEN.
- Die Objektträger aus der Färbelösung herausnehmen und 3 Minuten lang in entionisiertem Wasser spülen. Die Färbelösung entsorgen.
- Falls gewünscht, 5–10 Minuten in saurer Hämatoxylin-Lösung gegenfärben und unter Leitungswasser abspülen.
- Objektträger an der Luft trocknen lassen und mikroskopisch untersuchen. Wenn das Abdecken mit einem Deckglas erforderlich ist, darf nur ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden.

Verfahren für α-Naphthylacetatesterase

- Die Objektträger in Citrat-Aceton-Methanol-Fixiermittel 1 Minute lang bei Raumtemperatur (18–26 °C) fixieren.
- Gründlich in entionisiertem Wasser spülen und mindestens 20 Minuten an der Luft trocknen lassen.
- Zu 50 ml verdünnter TRIZMAL™ 7.6 Pufferlösung, auf 37 °C VORGEWÄRMT, unter ständigem Rühren den Inhalt von 1 Kapsel Echtblausalz RR hinzufügen.
- Nachdem das Salz vollständig im Puffer gelöst ist, 2 ml α-Naphthylacetat-Lösung hinzufügen. Die Lösung ist gelb und leicht trüb.
- 15 bis 20 Sekunden weiter rühren und die Mischung dann in den Coplin-Färbetrog geben. NICHT FILTRIEREN.
- Die Proben in die Färbelösung (aus Schritt 5) legen und 30 Minuten bei 37 °C inkubieren. HINWEIS: VOR LICHT SCHÜTZEN.
- Die Objektträger aus der Färbelösung herausnehmen und 3 Minuten lang in entionisiertem Wasser spülen. Die Färbelösung entsorgen.
- Falls gewünscht, für 5–10 Minuten in Mayer-Hämatoxylin-Lösung gegenfärben und unter Leitungswasser abspülen.
- Objektträger an der Luft trocknen lassen und mikroskopisch untersuchen. Wenn das Abdecken mit einem Deckglas erforderlich ist, darf nur ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden.

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 3–9 beschrieben durchführen.

α-Naphthylacetatesterase-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.³ 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.

- Die Objektträger in Citrat-Aceton-Methanol-Fixiermittel 1 Minute lang bei Raumtemperatur (18–26 °C) fixieren.
- Gründlich in entionisiertem Wasser spülen und mindestens 20 Minuten an der Luft trocknen lassen.
- 2 Bechergläser mit A und B beschriften und die folgenden Substanzen hinzugeben:

	Becherglas A	Becherglas B
Auf 37 °C vorgewärmter verdünnter TRIZMAL™ 7.6 Puffer	50 ml	50 ml
Unter ständigem Rühren Echtblau RR hinzufügen.	1 Kapsel*	1 Kapsel*
α-Naphthylacetat-Lösung	2 ml	2 ml
Natriumfluorid-Lösung	-	2 ml

* Inhalt von 1 Kapsel

- Gut mischen und in die mit A und B gekennzeichneten Coplin-Färbetröge füllen.
- Mit den in den Schritten 6 bis 9 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 zum Teil auf subjektive Interpretationen. 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	+

Ergebnisse

Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase

Dieses Enzym ist in der Regel spezifisch für Zellen mit granulozytärer Abstammung. Die Zellen weisen eine rote Granulierung auf. In Monozyten und Lymphozyten ist die Aktivität nur schwach ausgeprägt oder gar nicht vorhanden.

α-Naphthylacetatesterase

Unter den Testbedingungen (pH-Wert 7,6) lässt sich dieses Enzym 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 Aktivität auf.

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

Doppelfärbung mit Esterase

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

Die erwartete zelluläre Reaktivität der Tests auf Esteraseaktivität ist in Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II. Zytochemische Reaktionen von Blutzellen

Zelltyp	Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase	α-Naphthylacetatesterase
Myeloblasten	±	±
Promyelozyten	+	±
Neutrophile	+	—
Eosinophile	—	—
Basophile	±	—
Monozyten	—	+
Lymphozyten	—	±
Lymphoblasten	—	±
Megakaryozyten	—	+
Erythroblasten	—	±
Plasmazellen	—	±
Mastzellen	+	—
Haarzellen	—	±
Histozyten	±	+

Das Reagenssystem sollte durch Verwendung von Positiv- und Negativkontroll-Objektträgern überprüft 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
9010	Dimethylformamid	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
9011	Ethylenglykolmonomethylether	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
905	Naphthol-AS-D-Chloracetat	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
906	α-Naphthylacetat	Identität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
903C	TRIZMAL™ 6.3 Puffer-Konzentrat	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
902C	TRIZMAL™ 7.6 Puffer-Konzentrat	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
MHS1	Mayer-Hämatoxylin-Lösung	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
2852	Saure Hämatoxylin-Lösung	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
FBS25	Echtblausalz RR	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
9015	Echtkorinthsalz V	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
3861	Citratkonzentrat	Bereiche der Aktivität	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.

390A:



- H301 + H311 + H331 Giftig beim Verschlucken, bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann eine allergische Reaktion der Haut verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H341 Steht im Verdacht, genetische Defekte zu verursachen.
- H350 Kann Krebs erzeugen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- P273 Freisetzung in die Umwelt ist zu vermeiden.
- P280 Tragen Sie Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz.
- P301 + P310 BEI VERSCHLUCKEN: Rufen Sie sofort eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.
- P302 + P352 + P312 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE/einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.
- P304 + P340 + P311 BEIM EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie dafür, dass sie bequem atmen kann. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.
- P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.

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

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

11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Kontaktinformationen

Um eine Bestellung aufzugeben, besuchen Sie bitte unsere Website unter SigmaAldrich.com. Für den technischen Service besuchen Sie bitte die technische Service-Seite auf unserer Website unter 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. Material Sicherheitsdatenblatt 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. 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

Mode d'emploi

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

Procédure n° 90



Utilisation prévue

Les kits naphтол AS-D chloroacétate estérase et α -naphtyle acétate estérase de Sigma-Aldrich sont destinés à la coloration histologique générale en laboratoire. Les réactifs naphтол AS-D chloroacétate estérase et α -naphtyle acétate estérase sont réservés à un usage professionnel de « diagnostic *in vitro* ». Cette procédure histochimique manuelle et qualitative met en évidence l'activité de la chloroacétate estérase du naphтол 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 et constituent 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 de différencier les granulocytes des monocytes.¹⁻⁸

Pour réaliser le test, les frottis sanguins, les frottis médullaires ou les empreintes tissulaires sont incubés avec soit du naphтол AS-D-chloroacétate soit de l' α -naphtyle acétate en présence d'un sel de diazonium stable. 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.

Réactifs

Diméthylformamide (réf. 9010-25ML)

Diméthylformamide, 100 %. Danger. Liquide et vapeurs inflammables. Peut être nocif en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané. Provoque une irritation cutanée légère. Provoque une sévère irritation des yeux. Toxique par inhalation. Peut nuire au fœtus. Se procurer les instructions avant l'utilisation.

Éther monométhylrique de l'éthylène-glycol (réf. 9011-25ML)

2-méthoxyéthanol, 100 %. Danger. Liquide et vapeurs inflammables. Peut être nocif en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané. Provoque une irritation cutanée légère. Provoque une sévère irritation des yeux. Toxique par inhalation. Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. Se procurer les instructions avant l'utilisation.

Naphтол AS-D chloroacétate (réf. 905-10CAP)

Naphтол AS-D chloroacétate, 20 mg/gélule.

α -naphtyle acétate (réf. 906-10CAP)

Naphтол AS-D chloroacétate, 20 mg/gélule. Danger. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. 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.

Tampon concentré TRIZMAL™ 6.3 (réf. MHS1-50ML)

Maléate TRIZMA®, 200 mmol/l. Chloroforme ajouté comme conservateur.

Tampon concentré TRIZMAL™ 7.6 (réf. 902C-50ML)

Maléate TRIZMA®, 200 mmol/l. Chloroforme ajouté comme conservateur.

Solution d'hématoxyline de Mayer (réf. MHS1-100ML)

Hématoxyline, certifiée, CI 75290, 0,1 % (p/v) et stabilisateurs.

Solution d'hématoxyline acide (réf. 2852-100ML)

Hématoxyline, certifiée, CI 75290, 1 g/l et stabilisateurs, pH 3,3 à 25 °C.

Sel Fast Blue RR (réf. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Gélules prépesées. Le poids réel par gélule varie en fonction de la pureté du lot de colorant et a été optimisé par test.

Sel Fast Corinth V (réf. 9015-10CAP)

Sel Fast Corinth V, 18 à 22 mg/gélule. Danger. Nocif en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané. Nocif par inhalation. Peut provoquer le cancer. Se procurer les instructions avant l'utilisation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection.

Citrate concentré (réf. 3861-20ML)

Tampon citrate, 0,38 mol/l, pH 5,4 lorsqu'il est dilué conformément à la procédure.

Matériel spécial requis mais non fourni

- Méthanol, absolu
- Acétone, de qualité réactif ou de qualité ACS
- Solution de fluorure de sodium (réf. 919-25ML) fluorure de sodium, 2 g/dl

Conservation et stabilité

Le diméthylformamide, l'éther monométhylrique de l'éthylène glycol, le tampon concentré TRIZMAL™ 6.3, le tampon concentré TRIZMAL™ 7.6, la solution d'hématoxyline de Mayer et la solution d'hématoxyline acide, sont conservés à température ambiante (entre 18 et 26 °C).

Le naphтол AS-D-chloroacétate, l' α -naphtyle acétate et le sel Fast Blue RR sont conservés à une température inférieure à 0 °C.

Le sel Fast Corinth V et le citrate concentré sont conservés au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C).

Le naphтол AS-D-chloroacétate, l' α -naphtyle acétate, le sel Fast Blue RR et le sel Fast Corinth V sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur les étiquettes.

La solution de citrate diluée est stable pendant 1 semaine si elle est conservée hermétiquement fermée à température ambiante (entre 18 et 26 °C).

Le tampon concentré TRIZMAL™ 6.3, le tampon concentré TRIZMAL™ 7.6 et le citrate concentré peuvent être utilisés en l'absence de croissance microbienne.

Fluorure de sodium, 2 g/dl. Conserver à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Utilisé si la « Procédure d'inhibition de l' α -naphtyle acétate estérase par le fluorure » est réalisée.

Détérioration

Jeter le diméthylformamide et l'éther monométhylrique de l'éthylène glycol s'ils changent de couleur ou deviennent troubles.

La solution de tampon dilué TRIZMAL™ 6.3 et la solution de tampon dilué TRIZMAL™ 7.6 doivent être utilisées une fois puis jetées.

Jeter la solution d'hématoxyline de Mayer et la solution d'hématoxyline acide lorsque le temps nécessaire pour obtenir une coloration adéquate dépasse de plus de 5 minutes le temps recommandé dans la procédure.

Préparation

La solution de naphтол AS-D chloroacétate est préparée en dissolvant le contenu d'une (1) gélule de naphтол AS-D chloroacétate dans 2 ml de diméthylformamide. Sortir 1 gélule du congélateur au besoin. Préparer cette solution juste avant de l'utiliser.

La solution d' α -naphtyle acétate est préparée en dissolvant le contenu d'une (1) gélule d' α -naphtyle acétate dans 2 ml d'éther monométhylrique de l'éthylène glycol. Sortir 1 gélule du congélateur au besoin. Préparer cette solution juste avant de l'utiliser.

La solution de tampon dilué TRIZMAL™ 6.3 est préparée en mélangeant 1 volume de tampon concentré TRIZMAL™ 6.3 avec 9 volumes d'eau déionisée. Le pH doit être de 6,3 à 25 °C.

La solution de tampon dilué TRIZMAL™ 7.6 est préparée en mélangeant 1 volume de tampon concentré TRIZMAL™ 7.6 avec 9 volumes d'eau déionisée. Le pH doit être de 7,6 à 25 °C.

La solution d'hématoxyline de Mayer et la solution d'hématoxyline acide doivent être filtrées avant d'être utilisées.

La solution de citrate diluée est préparée en diluant 1 volume de citrate concentré avec 9 volumes d'eau déionisée. Le pH doit être de 5,4 une fois diluée.

Fixateur à base de citrate-acétone-méthanol : ajouter 27 ml d'acétone de qualité ACS et 5 ml de méthanol à 18 ml de solution de citrate diluée. Conserver hermétiquement fermée à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Jeter au bout de 8 heures.

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 cyto centrifugation peuvent être utilisés à la fois avec l' α -naphtyle acétate estérase et la naphтол 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 naphтол 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.^{5,9} 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.

Remarques

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.

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

Procédures

Procédure de détection de la naphтол AS-D chloroacétate estérase

- Fixer les lames pendant 1 minute dans le fixateur à base de citrate-acétone-méthanol à température ambiante (entre 18 et 26 °C).
- Les laver soigneusement à l'eau déionisée et les laisser sécher à l'air libre pendant au moins 20 minutes.
- À 50 ml de solution de tampon dilué TRIZMAL™ 6.3, PRÉCHAUFFÉE à 37 °C, ajouter, en mélangeant constamment, le contenu d'une (1) gélule de sel Fast Corinth V.
- Lorsque le sel est complètement dissous dans le tampon, ajouter 2 ml de solution de naphтол AS-D chloroacétate. La solution sera assez trouble.
- Continuer à mélanger pendant 15 à 30 secondes, puis verser dans une cuve à coloration de Coplin. NE PAS FILTRER.
- Placer les échantillons dans la solution de coloration (de l'étape 5) et laisser incubé à 37 °C pendant 5 minutes.
REMARQUE : PROTÉGER DE LA LUMIÈRE.
- Retirer les lames de la solution de coloration et les laver dans de l'eau déionisée pendant 3 minutes. Jeter la solution de coloration.

- Si nécessaire, contre-colorer dans la solution d'héματοxyline acide pendant 5 à 10 minutes et laver à l'eau du robinet.
- Laisser les lames sécher à l'air libre puis les examiner au microscope. S'il est nécessaire de monter les lames avec des lamelles couvre-objet, utiliser uniquement un milieu de montage aqueux.

Procédure de détection de l'α-naphtyle acétate estérase

- Fixer les lames dans le fixateur à base de citrate-acétone-méthanol à température ambiante (entre 18 et 26 °C) pendant 1 minute.
- Les laver soigneusement à l'eau déionisée et les laisser sécher à l'air libre pendant au moins 20 minutes.
- À 50 ml de solution de tampon dilué TRIZMAL™ 7.6, PRÉCHAUFFÉE à 37 °C, ajouter, en mélangeant constamment, le contenu d'une (1) gélule de sel Fast Blue RR.
- Lorsque le sel est complètement dissous dans le tampon, ajouter 2 ml de solution d'α-naphtyle acétate. La solution sera jaune et légèrement trouble.
- Continuer à mélanger pendant 15 à 20 secondes, puis verser dans une cuve à coloration de Coplin. NE PAS FILTER.
- Placer les échantillons dans la solution de coloration (de l'étape 5) et laisser incubé à 37 °C pendant 30 minutes. REMARQUE : PROTÉGER LA LUMIÈRE.
- Retirer les lames de la coloration et les laver pendant 3 minutes dans de l'eau déionisée. Jeter la solution de coloration.
- Si nécessaire, contre-colorer pendant 5 à 10 minutes dans la solution d'héματοxyline de Mayer et laver à l'eau du robinet.
- Laisser les lames sécher à l'air libre puis les examiner au microscope. S'il est nécessaire de monter les lames avec des lamelles couvre-objet, utiliser uniquement un milieu de montage aqueux.

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 3 à 9 de la procédure.

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.⁵ 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.

- Fixer les lames dans le fixateur à base de citrate-acétone-méthanol pendant 1 minute à température ambiante (entre 18 et 26 °C).
 - Les laver soigneusement à l'eau déionisée et les laisser sécher à l'air libre pendant au moins 20 minutes.
 - Étiqueter 2 béchers A et B et ajouter les solutions suivantes :
- | | Bécher A | Bécher B |
|---|-----------|-----------|
| Tampon dilué TRIZMAL™ 7.6 préchauffé à 37 °C | 50 ml | 50 ml |
| Ajouter le Fast Blue RR en mélangeant constamment | 1 gélule* | 1 gélule* |
| Solution d'α-naphtyle acétate | 2 ml | 2 ml |
| Solution de fluorure de sodium | - | 2 ml |
- * Contenu d'une (1) gélule
- Bien mélanger et verser dans des cuves à coloration de Coplin étiquetées A et B.
 - Procéder comme décrit aux étapes 6 à 9 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	+

Résultats

Naphtol AS-D chloroacétate estérase

Cette enzyme est habituellement considérée comme étant spécifique des cellules de la lignée granulocytaire. Les cellules doivent présenter des granulations rouges. L'activité est faible ou absente dans les monocytes et les lymphocytes.

α-naphtyle acétate estérase

Dans les conditions du test (pH 7,6), 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.

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

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.

La réactivité cellulaire attendue des tests de détection de l'activité des estérases est résumée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Réactions cytochimiques des cellules du sang

Type de cellules	Naphtol AS-D chloroacétate estérase	α-naphtyle acétate estérase
Myéloblastes	±	±
Promyélocytes	+	±
Neutrophiles	+	—
Éosinophiles	—	—
Basophiles	±	—
Monocytes	—	+
Lymphocytes	—	±
Lymphoblastes	—	±
Mégacaryocytes	—	+
Érythroblastes	—	±
Plasmocytes	—	±
Mastocytes	+	—
Tricholeucocytes	—	±
Histiocytes	±	+

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
9010	Diméthylformamide	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
9011	Éther monométhylque de l'éthylène-glycol	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
905	Naphtol AS-D chloroacétate	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
906	α-naphtyle acétate	Identité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
903C	Tampon concentré TRIZMAL™ 6.3	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
902C	Tampon concentré TRIZMAL™ 7.6	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
MHS1	Solution d'héματοxyline de Mayer	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
2852	Solution d'héματοxyline acide	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
FBS25	Sel Fast Blue RR	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
9015	Sel Fast Corinth V	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
3861	Citrate concentré	Sites d'activité	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.

390A :



H301 + H311 + H331 Toxique en cas d'ingestion, par contact cutané ou par inhalation.

H315 Provoque une irritation cutanée.

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

H318 Provoque des lésions oculaires graves.

H341 Susceptible d'induire des anomalies génétiques.

H350 Peut provoquer le cancer.

H410 Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

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.

P302 + P352 + P312 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P304 + P340 + P311 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.

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.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

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 <i>in vitro</i> . 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. 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.

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

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

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. 90



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 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 consentono di differenziare i granulociti dai monociti.¹⁻⁸

Per eseguire il test, incubare gli strisci ematici e midollari o le preparazioni per apposizione di tessuti con naftolo AS-D cloroacetato o α-naftil acetato in presenza di un sale di diazonio stabile. 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.

Reagenti

Dimetilformammide (N. di cat. 9010-25 ML)

Dimetilformammide, pericolo al 100%. Liquido e vapore infiammabili. Può essere nocivo in caso di ingestione. Nocivo a contatto con la pelle. Provoca una lieve irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Tossico se inalato. Può nuocere al feto. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

Monometilere del glicol etilenico (N. di cat. 9011-25ML)

2-metossietanolo. Pericolo al 100%. Liquido e vapore infiammabili. Può essere nocivo in caso di ingestione. Nocivo a contatto con la pelle. Provoca una lieve irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Tossico se inalato. Può nuocere alla fertilità o al feto. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

Naftolo AS-D cloroacetato (N. di cat. 905-10CAP)

Naftolo AS-D cloroacetato, 20 mg/capsula.

α-naftil acetato (N. di cat. 906-10CAP)

Naftolo AS-D cloroacetato, 20 mg/capsula. Pericolo. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. 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.

TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate (N. di cat. 903C-50ML)

TRIZMA® maleato, 200 mmol/l, cloroformio aggiunto come conservante.

TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate (N. di cat. 902C-50ML)

TRIZMA® maleato, 200 mmol/l, cloroformio aggiunto come conservante.

Soluzione di ematossilina di Mayer (N. di cat. MHS1-100ML)

Ematossilina certificata, C.I. 75290, 0,1% (p/v) e stabilizzanti.

Soluzione di ematossilina acida (N. di cat. 2852-100ML)

Ematossilina certificata, C.I. 75290, 1 g/l e stabilizzanti, pH 3,3 a 25 °C.

Sale Fast Blue RR (N. di cat. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Capsule prepesate. Il peso effettivo per capsula varia in base alla purezza del lotto di colorante ed è stato ottimizzato mediante saggio.

Sale Fast Corinth V (N. di cat. 9015-10CAP)

Sale Fast Corinth V, 18-22 mg/capsula. Pericolo. Nocivo se ingerito. Nocivo a contatto con la pelle. Nocivo se inalato. Può provocare il cancro. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. Indossare guanti/indumenti protettivi.

Concentrato di citrato (N. di cat. 3861-20ML)

Tampone citrato, 0,38 mol/l, pH 5,4 se diluito secondo le modalità previste dalla procedura

Materiali specifici necessari, ma non forniti in dotazione

- Etanolo, assoluto
- Acetone, reagente grado ACS
- Soluzione di fluoruro di sodio (N. di cat. 919-25 ML) Fluoruro di sodio, 2 g/dl

Conservazione e stabilità

Conservare la dimetilformammide, il monometilere del glicol etilenico, TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate, TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate, la soluzione di ematossilina di Mayer e la soluzione di ematossilina acida a temperatura ambiente (18-26 °C).

Conservare il naftolo AS-D cloroacetato, l'α-naftil acetato e il sale Fast Blue RR a temperatura inferiore a 0 °C.

Conservare il sale Fast Corinth V e il concentrato di citrato in frigorifero (2-8 °C).

Il naftolo AS-D cloroacetato, l'α-naftil acetato, il sale Fast Blue RR e il sale Fast Corinth V sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

La soluzione di citrato diluita è stabile per 1 settimana se conservata ben chiusa a temperatura ambiente (18-26 °C).

TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate, TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate e il concentrato di citrato sono idonei per l'uso in assenza di crescita microbica.

Fluoruro di sodio, 2 g/dl. Conservare a temperatura ambiente (18-26 °C). Utilizzato se si esegue la "Procedura per α-naftil acetato esterasi e inibizione con fluoruro".

Deterioramento

Scartare la dimetilformammide e il monometilere del glicol etilenico se appaiono colorati o torbidi.

Usare le soluzioni tampone per diluizione TRIZMAL™ 6.3 e TRIZMAL™ 7.6 una sola volta e poi scartarle dopo l'uso.

Scartare la soluzione di ematossilina di Mayer e la soluzione di ematossilina acida quando il tempo per ottenere una colorazione idonea è più lungo di oltre 5 minuti rispetto a quello raccomandato nella procedura.

Preparazione

Per preparare la soluzione di naftolo AS-D cloroacetato, sciogliere il contenuto di 1 capsula di naftolo AS-D cloroacetato in 2 ml di dimetilformammide. Prelevare 1 capsula dal congelatore secondo necessità. Preparare immediatamente prima dell'uso.

Per preparare la soluzione di α-naftil acetato, sciogliere il contenuto di 1 capsula di α-naftil acetato in 2 ml di monometilere del glicol etilenico. Prelevare 1 capsula dal congelatore secondo necessità. Preparare immediatamente prima dell'uso.

Per preparare la soluzione tampone diluita TRIZMAL™ 6.3, diluire 1 volume di TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate con 9 volumi di acqua deionizzata. Il pH deve essere 6,3 a 25 °C.

Per preparare la soluzione tampone diluita TRIZMAL™ 7.6, diluire 1 volume di TRIZMAL™ 7.6 Buffer Concentrate con 9 volumi di acqua deionizzata. Il pH deve essere 7,6 a 25 °C.

Filtrare la soluzione di ematossilina di Mayer e la soluzione di ematossilina acida prima dell'uso.

Per preparare la soluzione di citrato diluita, diluire 1 volume di concentrato di citrato con 9 volumi di acqua deionizzata. pH 5,4 se diluito.

Fissativo a base di citrato-acetone-metanolo: versare 27 ml di acetone di grado ACS e 5 ml di metanolo in 18 ml di soluzione di citrato diluita. Conservare ben chiuso a temperatura ambiente (18-26 °C). Scartare dopo 8 ore.

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.^{5,9} 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.

Note

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.

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

Procedure

Procedura per naftolo AS-D cloroacetato esterasi

1. Fissare i vetrini in fissativo a base di citrato-acetone-metanolo per 1 minuto, a temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavare accuratamente con acqua deionizzata e asciugare all'aria per almeno 20 minuti.
3. Versare il contenuto di 1 capsula di sale Fast Corinth V in 50 ml di soluzione tampone diluita TRIZMAL™ 6.3, PRERISCALDATA A 37 °C, mantenendo la miscela in costante agitazione.
4. Una volta che il sale si è completamente disciolto nel tampone, aggiungere 2 ml di soluzione di naftolo AS-D cloroacetato. La soluzione apparirà piuttosto torbida.
5. Continuare a mescolare per 15-30 secondi, quindi versare nella vaschetta tipo Coplin. NON FILTRARE.
6. Immergere i campioni nella soluzione colorante (ottenuta nel punto 5) e incubare a 37 °C per 5 minuti.
NOTA: TENERE AL RIPARO DALLA LUCE.
7. Prelevare i vetrini dalla soluzione colorante e lavarli con acqua deionizzata per 3 minuti. Scartare la soluzione colorante.
8. Volendo, controcolorare con soluzione di ematossilina acida per 5-10 minuti e lavare con acqua corrente.
9. Asciugare all'aria i vetrini ed esaminarli al microscopio. Se è necessario applicare vetrini coprioggetto, utilizzare solo un mezzo di montaggio acquoso.

Procedura per α-naftil acetato esterasi

1. Fissare i vetrini in fissativo a base di citrato-acetone-metanolo per 1 minuto a temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavare accuratamente con acqua deionizzata e asciugare all'aria per almeno 20 minuti.
3. Versare il contenuto di 1 capsula di sale Fast Blue RR in 50 ml di soluzione tampone diluita TRIZMAL™ 7.6, PRERISCALDATA A 37 °C, mantenendo la miscela in costante agitazione.
4. Una volta che il sale si è completamente disciolto nel tampone, aggiungere 2 ml di soluzione di α-naftil acetato. La soluzione apparirà gialla e leggermente torbida.
5. Continuare a mescolare per 15-20 secondi, quindi versare nella vaschetta tipo Coplin. NON FILTRARE.
6. Immergere i campioni nella soluzione colorante (ottenuta al punto 5) e incubare a 37 °C per 30 minuti. NOTA: TENERE AL RIPARO DALLA LUCE.
7. Prelevare i vetrini dalla soluzione colorante e lavarli con acqua deionizzata per 3 minuti. Scartare la soluzione colorante.
8. Volendo, controcolorare con soluzione di ematossilina di Mayer per 5-10 minuti e lavare con acqua corrente.
9. Asciugare all'aria i vetrini ed esaminarli al microscopio. Se è necessario applicare vetrini coprioggetto, utilizzare solo un mezzo di montaggio acquoso.

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 con acqua deionizzata per 5 minuti.
3. Eseguire il test per naftolo AS-D cloroacetato esterasi come descritto nei punti 3-9 della Procedura.

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.³ 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. Fissare i vetrini in fissativo a base di citrato-acetone-metanolo per 1 minuto a temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavare accuratamente con acqua deionizzata e asciugare all'aria per almeno 20 minuti.
3. Contrassegnare due becher con un'etichetta riportante rispettivamente A e B e procedere come segue:

	Becher A	Becher B
TRIZMAL™ 7.6 Dilute Buffer preriscaldato a 37 °C	50 ml	50 ml
Aggiungere Fast Blue RR, mantenendo la miscela in costante agitazione	1 capsula*	1 capsula*
Soluzione di α-naftil acetato	2 ml	2 ml
Soluzione di fluoruro di sodio	-	2 ml

*Contenuto di 1 capsula

4. Mescolare bene e versare nelle vaschette tipo Coplin etichettate A e B.
5. Procedere come descritto ai punti 6-9 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	+

Risultati

Naftolo AS-D cloroacetato esterasi

Quest'enzima si considera in genere specifico per le cellule della linea granulocitica. Le cellule dovrebbero evidenziare una granulazione di colore rosso. L'attività è debole o assente nei monociti e linfociti.

α-naftil acetato esterasi

Nelle condizioni del test (pH 7,6), questo enzima si rileva principalmente nei monociti, macrofagi e istiociti, mentre è praticamente assente nei granulociti. I monociti dovrebbero evidenziare una granulazione di colore nero. I linfociti possono talvolta esibire attività.

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

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.

Nella Tabella II è riassunta la reattività cellulare attesa dei test per l'attività esterasica.

Tabella II. Reazioni citochimiche delle cellule ematiche

Tipo di cellula	Naftolo AS-D cloroacetato esterasi	α-naftil acetato esterasi
Mieloblasti	±	±
Promielociti	+	±
Neutrofili	+	—
Eosinofili	—	—

Tipo di cellula	Naftolo AS-D cloroacetato esterasi	α-naftil acetato esterasi
Basofili	±	—
Monociti	—	+
Linfociti	—	±
Linfoblasti	—	±
Megacariociti	—	+
Eritroblasti	—	±
Plasmacellule	—	±
Mastociti	+	—
Cellule capellute	—	±
Istiociti	±	+

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
9010	Dimetilformam-mide	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
9011	Monometiltere del glicol etilenico	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
905	Naftolo AS-D cloroacetato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
906	α-naftil acetato	Identità	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
903C	TRIZMAL™ 6.3 Buffer Concentrate	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
902C	TRIZMA® 7.6 Buffer Concentrate	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
MHS1	Soluzione di ematossilina di Mayer	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
2852	Soluzione di ematossilina acida	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
FBS25	Sale Fast Blue RR	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
9015	Sale Fast Corinth V	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
3861	Concentrato di citrato	Sedi di attività	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.

H315 Provoca irritazione cutanea.

H317 Può provocare una reazione cutanea allergica.

H318 Provoca gravi lesioni oculari.

H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche.

H350 Può provocare il cancro.

H410 Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

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.

P302 + P352 + P312 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua. In presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P304 + P340 + P311 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

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.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Recapiti

Per effettuare un ordine, visitare il nostro sito web all'indirizzo SigmaAldrich.com. Per il servizio di assistenza tecnica, visitare l'apposita pagina dedicata sul nostro sito web all'indirizzo 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". Spostata l'espressione "ausilio per la diagnosi" nella sezione "Uso previsto". 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. 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 operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Instrucciones de uso

Kit de acetato de α-naftil leucocitario (es-terasa no específica) y cloroacetato de naftol AS-D leucocitario (esterasa específica)

Procedimiento n.º 90



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 medios para distinguir los granulocitos de los monocitos.¹⁻⁸

Para realizar la prueba, se incuba la sangre, las láminas de médula ósea o las preparaciones de improntas citológicas de tejido con cloroacetato de naftol AS-D o α-naftil acetato en presencia de una sal de diazonio estable. 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.

Reactivos

Dimetil formamida (N.º de cat. 9010-25ML)

Dimetil formamida, 100 % de peligro. Líquido y vapores inflamables. Puede ser nocivo en caso de ingestión. Nocivo en contacto con la piel. Provoca una leve irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Tóxico si se inhala. Puede dañar al feto. Obtener instrucciones especiales antes de su uso.

Éter monometílico de etilenglicol (N.º de cat. 9011-25ML)

2-metoxietanol, 100 % de peligro. Líquido y vapores inflamables. Puede ser nocivo en caso de ingestión. Nocivo en contacto con la piel. Provoca una leve irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Tóxico si se inhala. Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto. Obtener instrucciones especiales antes de su uso.

Cloroacetato de naftol AS-D (N.º de cat. 905-10CAP)

Cloroacetato de naftol AS-D, 20 mg/cap.

α-naftil acetato (N.º de cat. 906-10CAP)

Cloroacetato de naftol AS-D, 20 mg/cap. Peligro. Provoca lesiones oculares graves. Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara. 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.

Concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 6.3 (N.º de cat. 903C-50ML)

TRIZMA® maleato, 200 mmol/l, cloroformo añadido como conservante

Concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 7.6 (N.º de cat. 902C-50ML)

TRIZMA® maleato, 200 mmol/l, cloroformo añadido como conservante

Solución de hematoxilina de Mayer (N.º de cat. MHS1-100ML)

Hematoxilina, certificada, CI 75290, al 0,1 % (p/v), y estabilizadores

Solución de hematoxilina ácida (N.º de cat. 2852-100ML)

Hematoxilina, certificada, CI 75290, 1 g/l, y estabilizadores, pH 3,3 a 25 °C.

Sal Fast Blue RR (N.º de cat. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Cápsulas prepesadas. El peso real por cápsula variará en función de la pureza del lote de tinte y ha sido optimizado por ensayo.

Sal Fast Corinth V (N.º de cat. 9015-10CAP)

Sal Fast Corinth V, 18-22 mg/cap. Peligro. Nocivo en caso de ingestión. Nocivo en contacto con la piel. Nocivo si se inhala. Puede provocar cáncer. Obtener instrucciones especiales antes de su uso. Usar guantes/ropa de protección.

Concentrado de citrato (N.º de cat. 3861-20ML)

Solución amortiguadora de citrato, 0,38 mol/l, pH 5,4 cuando se diluye según el procedimiento

Material especial necesario pero no suministrado

- Metanol, absoluto
- Acetona, reactivo ACS
- Solución de fluoruro de sodio (N.º de cat. 919-25ML), Fluoruro de sodio, 2 g/dl

Almacenamiento y estabilidad

La dimetilformamida, el monometiléter de etilenglicol, el concentrado de amortiguador TRIZMAL™ 6.3, el concentrado de amortiguador TRIZMAL™ 7.6, la solución de hematoxilina de Mayer y la solución de hematoxilina ácida, se almacenan a temperatura ambiente (18-26 °C).

El cloroacetato de naftol AS-D, el α-naftil acetato y la sal Fast Blue RR se almacenan por debajo de 0 °C.

La sal Fast Corinth V y el concentrado de citrato se almacenan refrigerados (2-8 °C).

El cloroacetato de naftol AS-D, el α-naftil acetato, la sal Fast Blue RR y la sal Fast Corinth V son estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

La solución diluida de citrato es estable durante 1 semana si se almacena bien tapada a temperatura ambiente (18-26 °C).

El concentrado de amortiguador TRIZMAL™ 6.3, el concentrado de amortiguador TRIZMAL™ 7.6 y el concentrado de citrato son adecuados para su uso en ausencia de crecimiento microbiano.

Fluoruro de sodio, 2 g/dl. Almacenar a temperatura ambiente (18-26 °C). Se utiliza si se realiza el "Procedimiento de inhibición de α-naftil acetato esterasa con fluoruro".

Deterioro

Desechar la dimetilformamida y el monometiléter de etilenglicol si están coloreados o turbios.

Solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 6.3 y Solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 7.6 deben utilizarse una vez y luego desecharse.

Desechar la solución de hematoxilina de Mayer y la solución de hematoxilina ácida cuando el tiempo necesario para una tinción adecuada supere en más de 5 minutos el tiempo recomendado en el procedimiento.

Preparación

La solución de cloroacetato de naftol AS-D se prepara disolviendo el contenido de 1 cápsula de cloroacetato de naftol AS-D en 2 ml de dimetilformamida. Sacar 1 cápsula del congelador cuando sea necesario. Preparar inmediatamente antes de su uso.

La solución de acetato de α-naftilo se prepara disolviendo el contenido de 1 cápsula de α-naftil acetato en 2 ml de éter monometílico de etilenglicol. Sacar 1 cápsula del congelador cuando sea necesario. Preparar inmediatamente antes de su uso.

La solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 6.3 se prepara mezclando 1 volumen de concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 6.3 con 9 volúmenes de agua desionizada. El pH debe ser de 6,3 a 25 °C.

La solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 7.6 se prepara mezclando 1 volumen de concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 7.6 con 9 volúmenes de agua desionizada. El pH debe ser de 7,6 a 25 °C.

La solución de hematoxilina de Mayer y la de hematoxilina ácida deben filtrarse antes de su uso.

La solución diluida de citrato se prepara diluyendo 1 parte de concentrado de citrato con 9 partes de agua desionizada. El pH de la dilución es 5,4.

Fijador de citrato-acetona-metanol: A 18 ml de solución diluida de citrato, añadir 27 ml de acetona de grado ACS y 5 ml de metanol. Almacenar bien cerrado a temperatura ambiente (18-26 °C). Desechar después de 8 horas.

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 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 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.^{5,9} 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.

Notas

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 citotécnica 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.

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

Procedimientos

Procedimiento de cloroacetato-esterasa de naftol AS-D

1. Fijar los portaobjetos durante 1 minuto en fijador de citrato-acetona-metanol a temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavar a fondo con agua desionizada y secar al aire por lo menos 20 minutos.
3. A 50 ml de solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 6.3, PRECALENTADA A 37 °C, añadir con agitación constante, el contenido de 1 cápsula de sal Fast Corinth V.
4. Cuando la sal esté completamente disuelta en la solución amortiguadora, añadir 2 ml de solución de cloroacetato de naftol AS-D. La solución aparecerá bastante turbia.
5. Seguir mezclando durante 15-30 segundos y añadir al frasco Coplin. NO FILTRAR.
6. Colocar las muestras en la solución de tinción (del paso 5) e incubar a 37 °C durante 5 minutos.
NOTA: PROTEGER DE LA LUZ.
7. Retirar los portaobjetos del colorante y lavar en agua desionizada durante 3 minutos. Desechar la solución de tinción.
8. Si lo desea, realizar una contratinción en solución de hematoxilina ácida durante 5-10 minutos y lavar con agua del grifo.
9. Secar al aire los portaobjetos y evaluar al microscopio. Si se requiere un cubreobjetos, utilizar únicamente un medio de montaje acuoso.

Procedimiento de la α-naftil acetato esterasa

1. Fijar los portaobjetos en fijador de citrato-acetona-metanol durante 1 minuto a temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavar a fondo con agua desionizada y secar al aire por lo menos 20 minutos.
3. A 50 ml de solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 7.6, PRECALENTADA A 37°C, añadir con agitación constante el contenido de 1 cápsula de sal Fast Blue RR.
4. Cuando la sal esté completamente disuelta en la solución amortiguadora, añadir 2 ml de solución de α-naftil acetato. La solución será amarilla y ligeramente turbia.
5. Seguir mezclando durante 15-20 segundos y añadir al frasco Coplin. NO FILTRAR.
6. Colocar las muestras en la solución de tinción (del paso 5) e incubar a 37 °C durante 30 minutos. NOTA: PROTEGER DE LA LUZ.
7. Retirar los portaobjetos del colorante y lavar durante 3 minutos en agua desionizada. Desechar la solución de tinción.
8. Si se desea, realizar una contratinción durante 5-10 minutos en solución de hematoxilina de Mayer y lavar con agua del grifo.
9. Secar al aire los portaobjetos y evaluar al microscopio. Si se requiere un cubreobjetos, utilizar únicamente un medio de montaje acuoso.

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 los portaobjetos en agua desionizada durante 5 minutos.
3. Realizar la prueba del naftol AS-D cloroacetato esterasa como se describe en los pasos 3-9 del procedimiento.

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.⁵ 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. Fijar los portaobjetos en fijador de citrato-acetona-metanol durante 1 minuto a temperatura ambiente (18-26 °C).
 2. Lavar a fondo con agua desionizada y secar al aire por lo menos 20 minutos.
 3. Rotular dos vasos de precipitados con A y B y añadir lo siguiente:
- | | Vaso A | Vaso B |
|--|------------|------------|
| Solución amortiguadora diluida TRIZMAL™ 7.6 precalentada a 37 °C | 50 ml | 50 ml |
| Añadir con agitación constante, Fast Blue RR | 1 cápsula* | 1 cápsula* |
| Solución de α-naftil acetato | 2 ml | 2 ml |
| Solución de fluoruro de sodio | - | 2 ml |
- *Contenido de 1 cápsula
4. Mezclar bien y verter en los frascos Coplin etiquetados como A y B.
 5. Proceder como se describe en los pasos 6-9 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	+

Resultados

Cloroacetato-esterasa de naftol AS-D

Esta enzima suele considerarse específica para las células de linaje granulocítico. Las células deben mostrar una granulación roja. La actividad es débil o ausente en los monocitos y linfocitos.

α-naftil acetato esterasa

En las condiciones del ensayo (pH 7,6), esta 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.

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

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.

La reactividad celular esperada de las pruebas de actividad de la esterasa se resume en la tabla II.

Tabla II. Reacciones citoquímicas de las células sanguíneas

Tipo de célula	Cloroacetato-esterasa de naftol AS-D	α-naftil acetato esterasa
Mieloblastos	±	±
Promielocitos	+	±
Neutrófilos	+	—
Eosinófilos	—	—
Basófilos	±	—
Monocitos	—	+
Linfocitos	—	±
Linfoblastos	—	±
Megacariocitos	—	+
Eritroblastos	—	±
Células plasmáticas	—	±
Mastocitos	+	—
Células pilosas	—	±
Histiocitos	±	+

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
9010	Dimetil formamida	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
9011	Éter monometílico de etilenglicol	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
905	Cloroacetatode naftol AS-D	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
906	α-naftil acetato	Identidad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
903C	Concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 6.3	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
902C	Concentrado de solución amortiguadora TRIZMAL™ 7.6	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
MHS1	Solución de hematoxilina de Mayer	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
2852	Solución de hematoxilina ácida	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
FBS25	Sal Fast Blue RR	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
9015	Sal Fast Corinth V	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
3861	Concentrado de citrato	Lugares de actividad	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Tóxico en caso de ingestión, en contacto con la piel o si se inhala.

H315 Provoca irritación cutánea.

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

H318 Provoca lesiones oculares graves.

H341 Susceptible de provocar defectos genéticos.

H350 Puede provocar cáncer.

H410 Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos duraderos.

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.

P302 + P352 + P312 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si la persona no se encuentra bien.

P304 + P340 + P311 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.

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.

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

1. Beckmann H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wieggers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127-130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

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. Se ha movido la declaración de ayuda al diagnóstico al uso previsto. Se ha revisado el uso previsto para adaptarlo a las directrices europeas sobre DIV. 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 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

La M inicial y Sigma-Aldrich son marcas comerciales registradas de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania o sus filiales. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños. Puede consultarse la información detallada sobre las marcas comerciales en recursos accesibles al público.

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

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

Sigma-Aldrich®

Brugsanvisning

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

Procedure nr. 90



MERCK

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, knoglemarvsmembran 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 ser ud til at repræsentere en række forskellige enzymer, der reagerer på udvalgte substrater. Under definerede reaktionsbetingelser kan det være muligt at bestemme hæmopoietiske celletyper ved anvendelse af specifikke esterasesubstrater. De beskrevne metoder giver mulighed for at skelne granulocytter fra monocytter.¹⁻⁸

Testen udføres ved at inkubere blod, knoglemarvsmembran eller vævsberøringspræparater med enten naphthol-AS-D-chloroacetat eller α-naphthylacetat ved tilstedeværelse af et stabilt diazoniumsalt. Enzymatisk hydrolyse af esterbindinger frigiver frie naphtholforbindelser. Disse kobles med diazoniumsaltet og danner kraftigt farvede aflejringer på steder med enzymaktivitet.

Reagenser

Dimethylformamid (kat.nr. 9010-25ML)

Dimethylformamid, 100 %. Fare. Brandfarlig væske og damp. Kan være farlig ved indtagelse. Farlig ved hudkontakt. Forårsager mild hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Giftig ved indånding. Kan skade det ufødte barn. Indhent særlige anvisninger før brug.

Ethylenglycolmonomethylether (kat.nr. 9011-25ML)

2-methoxyethanol, 100 %. Fare. Brandfarlig væske og damp. Kan være farlig ved indtagelse. Farlig ved hudkontakt. Forårsager mild hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Giftig ved indånding. Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn. Indhent særlige anvisninger før brug.

Naphthol-AS-D-chloroacetat (kat.nr. 905-10CAP)

Naphthol-AS-D-chloroacetat, 20 mg/kapsel.

α-naphthylacetat (kat.nr. 906-10CAP)

Naphthol-AS-D-chloroacetat, 20 mg/kapsel. Fare. Forårsager alvorlig øjenskade. Bær beskyttelseshandsker/øjenskytelse/ansigtsbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJENNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

TRIZMAL™ 6.3-bufferkoncentrat (kat.nr. 903C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/l. Kloroform tilføjet som konserveringsmiddel.

TRIZMAL™ 7.6-bufferkoncentrat (kat.nr. 902C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/l. Kloroform tilføjet som konserveringsmiddel.

Mayers hæmatoxylinopløsning (kat.nr. MHS1-100ML)

Hæmatoxylin, certificeret, CI 75290, 0,1 % (vægt/vol.) og stabilisatorer.

Sur hæmatoxylinopløsning (kat.nr. 2852-100ML)

Hæmatoxylin, certificeret, CI 75290, 1 g/l, og stabilisatorer, pH 3,3 ved 25 °C.

Fast Blue RR-salt (kat.nr. FBS25-10CAP)

Fast Blue, CI 37155. Forvejede kapsler. Den faktiske vægt pr. kapsel vil variere afhængigt af farvestoffets renhed og er blevet optimeret efter analyse.

Fast Corinth V-salt (kat.nr. 9015-10CAP)

Fast Corinth V-salt, 18-22 mg/kapsel. Fare. Farlig ved indtagelse. Farlig ved hudkontakt. Farlig ved indånding. Kan fremkalde kræft. Indhent særlige anvisninger før brug. Bær beskyttelseshandsker/ beskyttelsestøj.

Citratkoncentrat (kat.nr. 3861-20ML)

Citratbuffer, 0,38 mol/l, pH 5,4 ved fortynding i henhold til proceduren.

Særlige materialer, som er påkrævede, men ikke medfølger

- Methanol, absolut
- Acetone, ACS-reagens
- Natriumfluoridopløsning (kat.nr. 919-25ML), natriumfluorid, 2 g/dl

Opbevaring og stabilitet

Dimethylformamid, ethylenglycolmonomethylether, TRIZMAL™ 6.3-bufferkoncentrat, TRIZMAL™ 7.6-bufferkoncentrat, Mayers hæmatoxylinopløsning og sur hæmatoxylinopløsning opbevares ved stuetemperatur (18-26 °C).

Naphthol-AS-D-chloroacetat, α-naphthylacetat og Fast Blue RR-salt skal opbevares ved under 0 °C.

Fast Corinth V-salt og citratkoncentrat opbevares på køl (2-8 °C).

Naphthol-AS-D-chloroacetat, α-naphthylacetat, Fast Blue RR-salt og Fast Corinth V-salt er stabile indtil udløbsdatoen på mærkaterne.

Fortyndet citratopløsning er stabil i 1 uge, hvis den opbevares tæt lukket ved stuetemperatur (18-26 °C).

TRIZMAL™ 6.3-bufferkoncentrat, TRIZMAL™ 7.6-bufferkoncentrat og citratkoncentrat er egnede til brug ved fravær af mikrobiel vækst.

Natriumfluorid, 2 g/dl. Opbevares ved stuetemperatur (18-26 °C). Anvendes, hvis "α-naphthylacetatesterase med fluoridinhæber-proceduren" udføres.

Forringelse

Bortskaf dimethylformamid og ethylenglycolmonomethylether, hvis de er farvede eller uklare.

Fortyndet TRIZMAL™ 6.3-bufferopløsning og fortyndet TRIZMAL™ 7.6-bufferopløsning må bruges én gang og skal derefter kasseres.

Mayers hæmatoxylin- og sur hæmatoxylinopløsning skal kasseres, når tiden til passende farvning overstiger den anbefalede tid i proceduren med mere end 5 minutter.

Forberedelse

Naphthol-AS-D-chloroacetatopløsning fremstilles ved at opløse indholdet af 1 kapsel med naphthol-AS-D-chloroacetat i 2 ml dimethylformamid. Tag 1 kapsel ud af fryseren efter behov. Forbered umiddelbart inden brug.

α-naphthylacetatopløsning fremstilles ved at opløse indholdet af 1 kapsel med α-naphthylacetat i 2 ml ethylenglycolmonomethylether. Tag 1 kapsel ud af fryseren efter behov. Forbered umiddelbart inden brug.

Fortyndet TRIZMAL™ 6.3-bufferopløsning fremstilles ved at blande 1 del TRIZMAL™ 6.3-bufferkoncentrat med 9 dele demineraliseret vand. pH skal være 6,3 ved 25 °C.

Fortyndet TRIZMAL™ 7.6-bufferopløsning fremstilles ved at blande 1 del TRIZMAL™ 7.6-bufferkoncentrat med 9 dele demineraliseret vand. pH skal være 7,6 ved 25 °C.

Mayers hæmatoxylin- og sur hæmatoxylinopløsning skal filtreres inden brug.

Fortyndet citratopløsning fremstilles ved at fortynde 1 del citratkoncentrat med 9 dele demineraliseret vand. pH skal være 5,4 efter fortynding.

Citrat-acetone-methanolfixativ: Tilsæt 27 ml acetone af ACS-kvalitet og 5 ml methanol til 18 ml fortyndet citratopløsning. Opbevares tæt lukket ved stuetemperatur (18-26 °C). Kasseres efter 8 timer.

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, knoglemarvsmembran, vævsberøringspræparater og cytocentrifugepræparater 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 knoglemarvsmembran kan opbevares fikseret ved stuetemperatur (18-26 °C) i flere uger eller ufikseret i flere dage uden nævneværdig ændring i aktivitet.^{5,9} 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.

Bemærkninger

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. Varmeovertørring gennem glas er hurtigere end gennem plastik, og derfor bør der anvendes Coplin-skåle.

Mange enzymsystemer 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.

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

Procedurer

Naphthol-AS-D-chloroacetatesterase-procedure

1. Fikser objektglassene i 1 minut i citrat-acetone-methanolfixativ ved stuetemperatur (18-26 °C).
2. Vask grundigt i demineraliseret vand, og lad dem lufttørre i mindst 20 minutter.
3. Tilsæt indholdet af 1 kapsel med Fast Corinth V-salt til 50 ml fortyndet TRIZMAL™ 6.3-bufferopløsning, som er FORVARMET TIL 37 °C, under konstant omrøring.
4. Når saltet er fuldstændigt opløst i bufferen, tilsættes 2 ml naphthol-AS-D-chloroacetatopløsning. Oplosningen vil fremstå ret grumset.
5. Fortsæt med at blande i 15-30 sekunder, og hæld den derefter i Coplin-skålen. UNDLAD AT FILTRERE.
6. Anbring prøver i farvningsopløsning (fra trin 5), og inkuber ved 37 °C i 5 minutter. BEMÆRK: SKAL BESKYTTES MOD LYS.
7. Fjern objektglassene fra farvningen, og vask dem i demineraliseret vand i 3 minutter. Bortskaf farvningsopløsningen.
8. Kontrastfarv eventuelt i sur hæmatoxylinopløsning i 5-10 minutter, og vask i postevand.
9. Lad objektglassene lufttørre, og evaluer dem mikroskopisk. Brug udelukkende vandige monteringsmedier, hvis dækglasser er påkrævet.

α-naphthylacetatesterase-procedure

1. Fikser objektglassene i citrat-acetone-methanolfixativ i 1 minut ved stuetemperatur (18-26 °C).
2. Vask grundigt i demineraliseret vand, og lad dem lufttørre i mindst 20 minutter.
3. Tilsæt indholdet af 1 kapsel med Fast Blue RR-salt til 50 ml fortyndet TRIZMAL™ 7.6-bufferopløsning, som er FORVARMET TIL 37 °C, under konstant omrøring.
4. Når saltet er fuldstændigt opløst i bufferen, tilsættes 2 ml α-naphthylacetat-opløsning. Oplosningen vil være gul og en smule uklar.

5. Fortsæt med at omrøre i 15-20 sekunder, og hæld den derefter i en Coplin-skål. UNDLAD AT FILTRERE.
6. Anbring prøver i farvningsopløsning (fra trin 5), og inkuber ved 37 °C i 30 minutter. BEMÆRK: SKAL BESKYTTES MOD LYS.
7. Fjern objektglassene fra farvningen, og vask dem i 3 minutter i demineraliseret vand. Bortskaf farvningsopløsningen.
8. Kontrastfarv eventuelt i 5-10 minutter i Mayers hæmatoxylinopløsning, og vask i postevand.
9. Lad objektglassene lufttørre, og evaluer dem mikroskopisk. Brug udelukkende vandige monteringsmedier, hvis dækglas er påkrævet.

Dobbeltfarvende esterase-procedure

1. Udfør α-naphthylacetatesterase-testen som beskrevet i proceduren. Undlad at kontrastfarve.
2. Skyl objektglassene i 5 minutter i demineraliseret vand.
3. Udfør naphthol-AS-D-chloracetatesterase-testen som beskrevet i procedurens trin 3-9.

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.⁵ 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.

1. Fikser objektglassene i citrat-acetone-methanolfixativ i 1 minut ved stuetemperatur (18-26 °C).
2. Vask grundigt i demineraliseret vand, og lad dem lufttørre i mindst 20 minutter.
3. Mærk 2 bægerglas A og B, og tilsæt følgende:

	Bægerglas A	Bægerglas B
Fortyndet TRIZMAL™ 7.6-buffer, der er forvarmet til 37 °C	50 ml	50 ml
Tilsæt Fast Blue RR under konstant omrøring	1 kapsel*	1 kapsel*
α-naphthylacetat-opløsning	2 ml	2 ml
Natriumfluoridopløsning	-	2 ml

*Indhold af 1 kapsel

4. Bland godt, og hæld i Coplin-skåle, der er mærket A og B.
5. Gå frem som beskrevet i trin 6-9 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	+

Resultater

Naphthol-AS-D-chloracetatesterase

Dette enzym anses normalt for at være specifikt for celler af granulocytisk afstamning. Cellerne skal vise rød granulering. Aktiviteten er svag eller fraværende i monocytter og lymfocytter.

α-naphthylacetatesterase

Under analysebetingelserne (pH 7,6) påvises dette enzym primært i monocytter, makrofager og histiocytter og er praktisk talt fraværende i granulocytter. Monocytter bør udvise sort granulering. Lymfocytter kan lejlighedsvist udvise aktivitet.

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

Dobbeltfarvende esterase

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

Den forventede cellulære reaktivitet af tests for esteraseaktivitet er opsummeret i tabel II.

Tabel II. Cytokemiske reaktioner i blodceller

Celletype	Naphthol-AS-D-chloracetatesterase	α-naphthylacetatesterase
Myeloblaster	±	±
Promyelocytter	+	±
Neutrofiler	+	—
Eosinofiler	—	—
Basofiler	±	—
Monocytter	—	+
Lymfocytter	—	±
Lymfoblaster	—	±
Megakaryocytter	—	+
Erythroblaster	—	±
Plasmaceller	—	±
Mastceller	+	—
Hårceller	—	±
Histiocytter	±	+

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-Aldrich teknisk 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.	Produkt-beskrivelse	Mål	Specificitet inden for analyse	Sensitivitet inden for analyse	Specificitet mellem analyser	Sensitivitet mellem analyser
9010	Dimethylformamid	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
9011	Ethylenglycolmono-methylether	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
905	Naphthol-AS-D-chloracetat	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
906	α-naphthylacetat	Identitet	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
903C	TRIZMAL™ 6.3-bufferkoncentrat	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
902C	TRIZMAL™ 7.6-bufferkoncentrat	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
MHS1	Mayers hæmatoxylinopløsning	Kerner	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
2852	Sur hæmatoxylinopløsning	Kerner	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
FBS25	Fast Blue RR-salt	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
9015	Fast Corinth V-salt	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
3861	Citratkoncentrat	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3

Advarsler og farer

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

390A:



- H301 + H311 + H331 Giftig ved indtagelse, ved kontakt med hud eller ved indånding.
- H315 Forårsager hudirritation.
- H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion.
- H318 Forårsager alvorlig øjenskab.
- H341 Mistænkt for at forårsage genetiske defekter.
- H350 Kan fremkalde kræft.
- H410 Meget giftig med langvarige virkninger for vandlevende organismer.
- P273 Undgå udledning til miljøet.
- P280 Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
- P301 + P310 I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Ring omgående til en GIFTINFORMATION/læge.
- P302 + P352 + P312 VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand. Kontakt GIFTLINJEN/en læge i tilfælde af ubehag.
- P304 + P340 + P311 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes. Ring til en GIFTINFORMATION/læge.
- P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaklinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127-130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

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. Flyttet udtalelse om hjælp ved diagnosticering til tilsigtet brug. Revideret tilsigtet brug for at tilpasse til IVDR-retningslinjer. Opdateret materialesikkerhedsdatablad 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. 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

Forbogstavet M og Sigma-Aldrich er varemærker tilhørende Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland, eller deres tilknyttede virksomheder. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere. Detaljerede oplysninger om varemærker kan indhentes via offentligt tilgængelige ressourcer.

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

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

Bruksanvisning

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

Förfarande nr. 90



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 cellulära 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 medel för att särskilja granulocyter från monocytter.¹⁻⁸

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

Reagenser

Dimetylformamid (kat.-nr. 9010-25ML)

Dimetylformamid, 100 % Fara. Brandfarlig vätska och ånga. Kan vara skadligt vid förtäring. Skadligt vid kontakt med hud. Orsakar lindrig hudirritation. Orsakar svår ögonirritation. Giftigt vid inandning. Kan skada det födda barnet. Skaffa speciella instruktioner före användning.

Etylenglykolmonometyleter (kat.-nr. 9011-25ML)

2-metoxyetanol, 100 % Fara. Brandfarlig vätska och ånga. Kan vara skadligt vid förtäring. Skadligt vid kontakt med hud. Orsakar lindrig hudirritation. Orsakar svår ögonirritation. Giftigt vid inandning. Kan skada fertiliteten eller det födda barnet. Skaffa speciella instruktioner före användning.

Naftol-AS-D-kloracetat (kat.-nr. 905-10CAP)

Naftol-AS-D-kloracetat, 20 mg/kap.

 α -naftylacetat (kat.-nr. 906-10CAP)

Naftol-AS-D-kloracetat, 20 mg/kap Fara. Orsakar allvarliga ögonskador. Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd. OM LÖSNINGEN KOMMER IN I ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

TRIZMAL™ 6.3 buffertkoncentrat (kat.-nr. 903C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/l, kloroform tillsatt som konserveringsmedel

TRIZMAL™ 7.6 buffertkoncentrat (kat.-nr. 902C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/l, kloroform tillsatt som konserveringsmedel

Mayers hematoxylinlösning (kat.-nr. MHS1-100ML)

Hematoxylin, certifierad, CI 75290, 0,1 % (vikt/volym), och stabiliseringsmedel

Sur hematoxylinlösning (kat.-nr. 2852-100 ML)

Hematoxylin certifierad, CI 75290, 1 g/l, och stabiliseringsmedel, pH 3,3 vid 25 °C

Fast Blue RR-salt (kat.-nr. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Färgvägda kapslar. Faktiskt vikt per kapsel varierar baserat på renheten i färgämnespartiet och har optimerats genom analys.

Fast Corinth V-salt (kat.-nr. 9015-10CAP)

Fast Corinth V-salt, 18–22 mg/kap. Fara. Skadligt vid förtäring. Skadligt vid kontakt med hud. Skadligt vid inandning. Kan orsaka cancer. Skaffa speciella instruktioner före användning. Använd skyddshandskar/skyddskläder.

Citratkoncentrat (kat.-nr. 3861-20ML)

Citratbuffert, 0,38 mol/l, pH 5,4 vid utspädning enligt förfarande

Särskilt material som krävs men inte tillhandahålls

- Metanol, absolut
- Aceton, ACS-reagens
- Natriumfluoridlösning (kat.-nr. 919-25ML) natriumfluorid, 2 g/dl

Förvaring och hållbarhet

Dimetylformamid, etylenglykolmonometyleter, TRIZMAL™ 6.3 buffertkoncentrat, TRIZMAL™ 7.6 buffertkoncentrat, Mayers hematoxylinlösning och sur hematoxylinlösning förvaras i rumstemperatur (18–26 °C).

Naftol-AS-D-kloracetat, α -naftylacetat och Fast Blue RR-alt förvaras under 0 °C.

Fast Corinth V-salt och citratkoncentrat förvaras i kylskåp (2–8 °C).

Naftol-AS-D-kloracetat, α -naftylacetat, Fast Blue RR-salt och Fast Corinth V-salt är stabila fram till utgångsdatumet som står på märkningen.

Utspädd citratlösning är stabil i 1 vecka om den förvaras tätt tillsluten i rumstemperatur (18–26 °C).

TRIZMAL™ 6.3 buffertkoncentrat, TRIZMAL™ 7.6 buffertkoncentrat och citratkoncentrat är lämpliga för användning vid frånvaro av mikrobiell tillväxt.

Natriumfluorid, 2 g/dl. Förvara i rumstemperatur (18–26 °C). Använd om "förfarande för α -naftylacetatesteras med fluoridhämmning" utförs.

Försämring

Kassera dimetylformamid och etylenglykolmonometyleter om färgad eller grumlig.

TRIZMAL™ 6.3 utspädd buffertlösning och TRIZMAL™ 7.6 utspädd buffertlösning bör endast användas en gång och sedan kasseras.

Kassera Mayers hematoxylin och sur hematoxylinlösning när tiden som krävs för lämplig färgning överskrider den tid som rekommenderas i förfarandet med mer än 5 minuter.

Beredning

Naftol-AS-D-kloracetatlösning bereds genom att lösa upp innehållet i 1 kapsel naftol-AS-D-kloracetat i 2 ml dimetylformamid. Ta ut en kapsel ur frysen efter behov. Bered omedelbart före användning.

α -naftylacetatlösning bereds genom att lösa upp innehållet i 1 kapsel α -naftylacetat i 2 ml etylenglykolmonometyleter. Ta ut en kapsel ur frysen efter behov. Bered omedelbart före användning.

TRIZMAL™ 6.3 utspädd buffertlösning framställs genom att blanda 1 volym TRIZMAL™ 6.3 buffertkoncentrat med 9 volymer avjoniserat vatten. pH bör vara 6,3 vid 25 °C.

TRIZMAL™ 7.6 utspädd buffertlösning framställs genom att blanda 1 volym TRIZMAL™ 7.6 buffertkoncentrat med 9 volymer avjoniserat vatten. pH bör vara 7,6 vid 25 °C.

Mayers hematoxylin och sur hematoxylinlösning bör filtreras före användning.

Utspädd citratlösning framställs genom att blanda 1 volym citratkoncentrat med 9 volymer avjoniserat vatten. pH 5,4 utspädd.

Citratacetometanolfixeringsmedel: Lägg till 27 ml aceton av ACS-grad och 5 ml metanol till 18 ml utspädd citratlösning. Förvara tätt tillsluten i rumstemperatur (18–26 °C). Kassera efter 8 timmar.

Försiktighetsåtgärder

De medicintekniska produkterna för in vitro-diagnostik som ingår i dessa kit är avsedda att användas i klinisk laboriemiljö. 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 laboratorieutrustning samt har tillräckligt bra färgseende 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

Ingå 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 anticoagulant.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.^{5,9} Frakta inte helblod för analys på andra laboratorier. Skicka fixerade eller ofixerade objektglas. Objektglaset ska förvaras svalt under transporten. Låt filmerna torka minst 1 timme före fixering.

Anmärkningar

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 effektivt än varmluftsinkubatorer och bör användas för enzymcytokemiska metoder. Värmeöverföring genom glas är snabbare än genom plast och därför bör Coplin-burkar användas.

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

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

Förfaranden

Förfarande för naftol-AS-D-kloracetatesteras

- Fixera objektglas i 1 minut i citratacetometanolfixeringsmedel i rumstemperatur (18–26 °C).
- Tvätta ordentligt i avjoniserat vatten och lufttorka i minst 20 minuter.
- Lägg till innehållet i 1 kapsel Fast Corinth V-salt till 50 ml TRIZMAL™ 6.3 utspädd buffertlösning, FÖRVÄRM TILL 37 °C, under konstant omrörning.
- När saltet helt har lösts upp i bufferten ska du tillsätta 2 ml naftol-AS-D-kloracetatlösning. Lösningen kommer att se ganska grumlig ut.
- Fortsätt blanda i 15–30 sekunder och håll sedan i Coplin-burk. FILTRERA INTE.
- Placera prover i färgningslösningen (från steg 5) och inkubera vid 37 °C i 5 minuter. OBS! SKYDDA FRÅN LJUS.
- Ta bort objektglaset från färgningen och tvätta i avjoniserat vatten i 3 minuter. Kassera färgningslösningen.
- Motfärga vid önskemål i sur hematoxylinlösning i 5–10 minuter och skölj i kravatten.
- Lufttorka objektglas och utvärdera mikroskopiskt. Om täckglas behövs ska endast ett vattenbaserat monteringsmedium användas.

Förfarande för α -naftylacetatesteras

- Fixera objektglas i citratacetometanolfixeringsmedel i 1 minut i rumstemperatur (18–26 °C).
- Tvätta ordentligt i avjoniserat vatten och lufttorka i minst 20 minuter.
- Lägg till innehållet i 1 kapsel Fast Blue RR-salt till 50 ml TRIZMAL™ 7.6 utspädd buffertlösning, FÖRVÄRM TILL 37 °C, under konstant omrörning.
- När saltet helt har lösts upp i bufferten ska du tillsätta 2 ml α -naftylacetatlösning. Lösningen kommer vara gul och något grumlig.
- Fortsätt röra i 15–20 sekunder och håll sedan i Coplin-burk. FILTRERA INTE.
- Placera prover i färgningslösningen (från steg 5) och inkubera vid 37 °C i 30 minuter. OBS! SKYDDA FRÅN LJUS.
- Ta bort objektglaset från färgningen och tvätta i avjoniserat vatten i 3 minuter. Kassera färgningslösningen.

- 8. Motfärga vid önskemål i 5–10 minuter i Mayers hematoxylinlösning och skölj i kranvatten.
- 9. Lufttorka objektglas och utvärdera mikroskopiskt. Om täckglas behövs ska endast ett vattenbaserat monteringsmedium användas.

Förfarande med dubbelfärgningsesteras

- 1. Utför α-naftylacetatesterastest som beskrivits i förfarandet. Motfärga inte.
- 2. Skölj objektglasen i 5 minuter i avjoniserat vatten.
- 3. Utför naftol-AS-D-kloracetatesterastest enligt beskrivningen i förfarandets steg 3–9.

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.⁵ 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 fluoridhämmningstest.

- 1. Fixera objektglas i citratacetonnmetanolfixeringsmedel i 1 minut i rumstemperatur (18–26 °C).
- 2. Tvätta ordentligt i avjoniserat vatten och lufttorka i minst 20 minuter.
- 3. Märk 2 bägare A och B och tillsätt följande:

	Bägare A	Bägare B
Förvärmd 37 °C TRIZMAL™ 7.6 utspädd buffert	50 ml	50 ml
Lägg till Fast Blue RR under konstant omrörning	1 kapsel*	1 kapsel*
α-naftylacetatlösning	2 ml	2 ml
Natriumfluoridlösning	-	2 ml

*Innehållet i 1 kapsel

- 4. Blanda väl och håll i Coplin-burkar märkta A och B.
- 5. Fortsätt som beskrivits i steg 6–9 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 något baserade på subjektiva tolkningar. Ett föreslaget 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	+

Resultat

Naftol-AS-D-kloracetatesteras

Detta enzym anses vanligtvis specifikt för granulocyta celler. Cellerna bör uppvisa röd granulering. Aktiviteten är svag eller frånvarande i monocyter och lymfocyter.

α-naftylacetatesteras

Under analysförhållandena (pH 7,6) detekteras denna enzym främst i monocyter, makrofager och histiocyter och är praktiskt taget frånvarande i granulocyter. Monocyter bör uppvisa svart granulering. Lymfocyter kan stundtals visa aktivitet.

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 resistenta mot natriumfluorid.¹⁰

Dubbelfärgningsesteras

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

Förväntad cellreaktivitet för tester för esterasaktivitet summeras i tabell II.

Tabell II. Cytokemiska reaktioner i blodceller

Celltyp	Naftol-AS-D-kloracetatesteras	α-naftylacetatesteras
Myeloblaster	±	±
Promyelocyter	+	±
Neutrofiler	+	—
Eosinofiler	—	—
Basofiler	±	—
Monocyter	—	+
Lymfocyter	—	±
Lymfoblaster	—	±
Megakaryocyter	—	+
Erytroblaster	—	±
Plasmaceller	—	±
Mastceller	+	—
Härceller	—	±
Histiocyter	±	+

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
9010	Dimetylformamid	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
9011	Etylenglykolmono-metyleter	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
905	Naftol-AS-D-kloracetat	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
906	α-naftylacetat	Identitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
903C	TRIZMAL™ 6.3 buffertkoncentrat	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
902C	TRIZMAL™ 7.6 buffertkoncentrat	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
MHS1	Mayers hematoxy-linlösning	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
2852	Sur hematoxylin-lösning	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
FBS25	Fast Blue RR-salt	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
9015	Fast Corinth V-salt	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
3861	Citratkoncentrat	Aktivitets-ställen	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Giftigt vid förtäring, vid hudkontakt och vid inandning.

H315 Orsakar hudirritation.

H317 Kan orsaka en allergisk hudreaktion.

H318 Orsakar allvarliga ögonskador.

H341 Misstänks orsaka genetiska defekter.

H350 Kan orsaka cancer.

H410 Mycket giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.

P273 Undvik utsläpp i miljön.

P280 Använd skyddshandskar/skyddskläder/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

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

P302 + P352 + P312 VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare om du mår dåligt.

P304 + P340 + P311 VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att personen andas utan problem. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

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.

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

1. Beckmann H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Kontaktuppgifter

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

Revisionshistorik

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

Överfört till ny mall med nuvarande varumärke. Specificerat "För yrkesmässigt bruk" under "Avsedd användning" och under "Försiktighetsåtgärder". Flyttat påståendet "Hjälpmedel för diagnostisering" till "Avsedd användning". 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. 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 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 90



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 e parecem representar 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 meios para distinguir granulócitos de monócitos.¹⁻⁸

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

Reagentes

Dimetilformamida (N.º de cat. 9010-25ML)

Dimetilformamida, 100% de perigo. Líquido e vapor inflamáveis. Pode ser nocivo por ingestão. Nocivo em contacto com a pele. Provoca irritação cutânea ligeira. Provoca irritação ocular grave. Tóxico por inalação. Pode afetar o nascituro. Pedir instruções específicas antes da utilização.

Éter monometílico de etilenoglicol (N.º de cat. 9011-25ML)

2-Metoxietanol, 100% de perigo. Líquido e vapor inflamáveis. Pode ser nocivo por ingestão. Nocivo em contacto com a pele. Provoca irritação cutânea ligeira. Provoca irritação ocular grave. Tóxico por inalação. Pode afetar a fertilidade ou o nascituro. Pedir instruções específicas antes da utilização.

Cloroacetato de naftol AS-D (N.º de cat. 905-10CAP)

Cloroacetato de naftol AS-D, 20 mg/cáp.

Acetato de α -naftilo (N.º de cat. 906-10CAP)

Cloroacetato de naftol AS-D, 20 mg/cáp. Perigo. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. 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.

Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 6,3 (N.º de cat. 903C-50ML)

Maleato TRIZMA®, 200 mmol/l. Clorofórmio adicionado como conservante.

Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 7,6 (N.º de cat. 902C-50ML)

Maleato TRIZMA®, 200 mmol/l. Clorofórmio adicionado como conservante.

Solução de Hematoxilina de Mayer (Cat. N.º MHS1-100ML)

Hematoxilina, certificada, CI 75290, 0,1% (p/v) e estabilizadores

Solução de Hematoxilina ácida (N.º de cat. 2852-100ML)

Hematoxilina certificada, CI 75290, 1 g/l e estabilizadores, pH 3,3 a 25 °C

Sal azul rápido RR (N.º de cat. FBS25-10CAP)

Azul rápido, C.I. 37155. Cápsulas pré-pesadas. O peso real por cápsula varia de acordo com a pureza do lote do corante e foi otimizado por ensaio.

Sal rápido Corinth V (N.º de cat. 9015-10CAP)

Sal rápido Corinth V, 18–22 mg/cáp. Perigo. Nocivo por ingestão. Nocivo em contacto com a pele. Nocivo por inalação. Pode causar cancro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Usar luvas de proteção/roupa de proteção.

Solução de Citrato (N.º de cat. 3861-20ML)

Tampão de Citrato, 0,38 mol/l, pH 5,4 quando diluído de acordo com o procedimento

Materiais especiais necessários mas não fornecidos

- Metanol, absoluto
- Acetona, Reagente ACS
- Solução de Fluoreto de sódio (N.º de cat. 919-25ML) Fluoreto de sódio, 2 g/dl

Conservação e estabilidade

A Dimetilformamida, o Éter monometílico de etilenoglicol, o Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 6,3, o Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 7,6, a Solução de Hematoxilina de Mayer e a Solução de Hematoxilina ácida são conservados à temperatura ambiente (18-26 °C).

O Cloroacetato de naftol AS-D, o Acetato de α -naftilo e o Sal azul rápido RR são conservados a uma temperatura inferior a 0 °C.

O Sal rápido Corinth V e o Concentrado de Citrato são conservados refrigerados (2-8 °C).

O Cloroacetato de naftol AS-D, o Acetato de α -naftilo, o Sal azul rápido RR e o Sal rápido Corinth V são estáveis até à data de validade indicada nos rótulos.

A Solução diluidora de Citrato é estável durante 1 semana se conservada firmemente tapada à temperatura ambiente (18-26 °C).

O Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 6,3, o Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 7,6 e o Concentrado de Citrato são adequados para utilização na ausência de crescimento microbiano.

Fluoreto de sódio, 2 g/dl. Conservar à temperatura ambiente (18-26 °C). Utilizado se for realizado o "Procedimento de esterase de acetato de α -naftilo com inibição do fluoreto".

Deterioração

Eliminar a Dimetilformamida e o Éter monometílico de etilenoglicol se colorido ou turvo.

A Solução de Tampão diluidor TRIZMAL™ 6,3 e a Solução de Tampão diluidor TRIZMAL™ 7,6 devem ser usadas uma vez e, em seguida, eliminadas.

Eliminar a Solução de hematoxilina de Mayer e a Solução de Hematoxilina ácida quando o tempo necessário para obter uma coloração adequada exceder o tempo recomendado no procedimento em mais de 5 minutos.

Preparação

A Solução de Cloroacetato de naftol AS-D é preparada dissolvendo o conteúdo de 1 cápsula de Cloroacetato de naftol AS-D em 2 ml de Dimetilformamida. Remover 1 cápsula do congelador, conforme necessário. Preparar imediatamente antes de usar.

A Solução de Acetato de α -naftilo é preparada dissolvendo o conteúdo de 1 cápsula Acetato de α -naftilo em 2 ml de Éter monometílico de etilenoglicol. Remover 1 cápsula do congelador, conforme necessário. Preparar imediatamente antes de usar.

A Solução diluidora de Tampão TRIZMAL™ 6,3 é preparada misturando 1 parte de Concentrado de tampão TRIZMAL™ 6,3 com 9 partes de água desionizada. O pH deve ser de 6,3 a 25 °C.

A Solução diluidora de Tampão TRIZMAL™ 7,6 é preparada misturando 1 parte de Concentrado de tampão TRIZMAL™ 7,6 com 9 partes de água desionizada. O pH deve ser de 7,6 a 25 °C.

A Solução de Hematoxilina de Mayer e a Solução de Hematoxilina ácida devem ser filtradas antes da utilização.

A Solução diluidora de Citrato é preparada diluindo 1 parte de Concentrado de Citrato com 9 partes de água desionizada; com um pH de 5,4 quando diluída.

Fixador de citrato-acetona-metanol: A 18 ml de Solução diluidora de Citrato, adicionar 27 ml de Acetona de grau ACS e 5 ml de Metanol. Conservar firmemente tapado à temperatura ambiente (18-26 °C). Eliminar após 8 horas.

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 percepção 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. 5,9 Não expedir sangue total para ensaio noutros laboratórios. Enviar lâminas fixadas ou não fixadas. As lâminas devem ser mantidas refrigeradas em trânsito. Permitir que as películas sequem durante, pelo menos, 1 hora antes da fixação.

Notas

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 citotécnica enzimática. A transferência de calor através de vidro é mais rápida do que através de plástico, pelo que devem ser utilizadas jaras 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.

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

Procedimentos

Procedimento de Esterase de cloroacetato de naftol AS-D

- Fixar as lâminas durante 1 minuto num Fixador de citrato-acetona-metanol à temperatura ambiente (18-26 °C).
- Lavar cuidadosamente em água desionizada e deixar secar ao ar durante, pelo menos, 20 minutos.
- A 50 ml de Solução de Tampão diluidor TRIZMAL™ 6,3, PRÉ-AQUECIDA ATÉ 37 °C, adicionar, com agitação constante, o conteúdo de 1 cápsula de Sal rápido Corinth V.
- Quando o sal estiver completamente dissolvido no tampão, adicionar 2 ml de Solução de Cloroacetato de naftol AS-D. A solução irá surgir bastante turva.
- Continuar a misturar durante 15–30 segundos e, em seguida, adicionar à jarra de Coplin. NÃO FILTRAR.
- Colocar as amostras em solução de coloração (a partir do Passo 5) e incubar a 37 °C durante 5 minutos.
NOTA: PROTEGER DA LUZ.
- Remover as lâminas da coloração e lavar em água desionizada durante 3 minutos. Eliminar a solução de coloração.
- Se pretendido, efetuar a contracoloração em Solução de Hematoxilina ácida durante 5–10 minutos e lavar em água da torneira.
- Deixar secar ao ar as lâminas e examinar microscopicamente. Se for necessário utilizar lamelas, utilizar apenas um meio de montagem aquoso.

Procedimento de Esterase de acetato de α-naftilo

1. Fixar as lâminas num Fixador de citrato-acetona-metanol durante 1 minuto à temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavar cuidadosamente em água desionizada e deixar secar ao ar durante, pelo menos, 20 minutos.
3. A 50 ml de Solução de Tampão diluidor TRIZMAL™ 7,6, PRÉ-AQUECIDA ATÉ 37 °C, adicionar, com agitação constante, o conteúdo de 1 cápsula de Sal azul rápido RR.
4. Quando o sal estiver completamente dissolvido no tampão, adicionar 2 ml de Solução de Acetato de α-naftilo. A solução será amarela e ligeiramente turva.
5. Continuar a agitar durante 15–20 segundos e, em seguida, adicionar à jarra de Coplin. NÃO FILTRAR.
6. Colocar as amostras em solução de coloração (a partir do Passo 5) e incubar a 37 °C durante 30 minutos. NOTA: PROTEGER DA LUZ.
7. Remover as lâminas da coloração e lavar, durante 3 minutos, em água desionizada. Eliminar a solução de coloração.
8. Se pretendido, efetuar a contracoloração, durante 5–10 minutos, em Solução de Hematoxilina de Mayer e lavar em água da torneira.
9. Deixar secar ao ar as lâminas e examinar microscopicamente. Se for necessário utilizar lamelas, utilizar apenas um meio de montagem aquoso.

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 as lâminas, durante 5 minutos, em água desionizada.
3. Realizar o teste de Esterase de cloroacetato de naftol AS-D conforme descrito nos Passos 3–9 do Procedimento.

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.⁵ 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. Fixar as lâminas num Fixador de citrato-acetona-metanol durante 1 minuto à temperatura ambiente (18-26 °C).
2. Lavar cuidadosamente em água desionizada e deixar secar ao ar durante, pelo menos, 20 minutos.
3. Rotular dois copos A e B e adicionar o seguinte:

	Copo A	Copo B
Solução de Tampão diluidor TRIZMAL™ 7,6 pré-aquecido até 37 °C	50 ml	50 ml
Adicionar com agitação constante, Sal azul rápido RR	1 cápsula*	1 cápsula*
Solução de Acetato de α-naftilo	2 ml	2 ml
Solução de Fluoreto de sódio	-	2 ml

*Conteúdo de 1 cápsula

4. Misturar bem e verter para as jaras de Coplin rotuladas com A e B.
5. Prosseguir conforme descrito nos Passos 6–9 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	+

Resultados

Esterase de cloroacetato de naftol AS-D

Geralmente, esta enzima é considerada específica para células de linhagem granulocítica. As células devem exibir uma granulação vermelha. A atividade é fraca ou ausente em termos de monócitos e linfócitos.

Esterase de acetato de α-naftilo

Nas condições do ensaio (pH 7,6), esta 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.

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

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.

A reatividade celular esperada dos testes da atividade da esterase está resumida na Tabela II.

Tabela II. Reações citoquímicas das células sanguíneas

Tipo de célula	Esterase de cloroacetato de naftol AS-D	Esterase de acetato de α-naftilo
Mieloblastos	±	±
Promielócitos	+	±
Neutrófilos	+	—
Eosinófilos	—	—
Basófilos	±	—

Tipo de célula	Esterase de cloroacetato de naftol AS-D	Esterase de acetato de α-naftilo
Monócitos	—	+
Linfócitos	—	±
Linfoblastos	—	±
Megacariócitos	—	+
Eritroblastos	—	±
Plasmócitos	—	±
Mastócitos	+	—
Células pilosas	—	±
Histiócitos	±	+

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
9010	Dimetilformamida	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
9011	Éter monometílico de etilenoglicol	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
905	Cloroacetato de naftol AS-D	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
906	Acetato de α-naftilo	Identidade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
903C	Concentrado de TampãoTRIZMAL™ 6,3	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
902C	Concentrado de Tampão TRIZMAL™ 7,6	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
MHS1	Solução de Hematoxilina de Mayer	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
2852	Solução de Hematoxilina ácida	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
FBS25	Sal azul rápido RR	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
9015	Sal rápido Corinth V	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
3861	Concentrado de Citrato	Locais de atividade	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Tóxico por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação.

H315 Provoca irritação cutânea.

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

H318 Provoca lesões oculares graves.

H341 Suspeito de provocar anomalias genéticas

H350 Pode provocar cancro.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

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.

P302 + P352 + P312 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente com água. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P304 + P340 + P311 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

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.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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, Sliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
- 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, 1973.74.

Informações de contacto

Para encomendar, visite o nosso site em [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Para Assistência técnica, visite a página de assistência técnica no nosso site [SigmaAldrich.com/techservice](https://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. 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 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. 90



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 φιλμ 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 αιμοποητικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας ειδικά υποστρώματα εστεράσης. Οι περιγραφόμενες μέθοδοι παρέχουν μέσα για τη διάκριση των κοκκιοκυττάρων από τα μονοκύτταρα.¹⁻⁸

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

Αντιδραστήρια

Διμεθυλοφορμαμίδιο (Αρ. καταλόγου 9010-25ML)

Διμεθυλοφορμαμίδιο, 100% Κίνδυνος. Υγρό και αιγίο εύφλεκτο. Μπορεί να είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα. Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής. Μπορεί να βλάψει το έμβρυο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

Μονομεθυλαιθέρας αιθυλενογλυκόλης (Αρ. καταλόγου 9011-25ML)

2-Μεθοξυ-αιθανόλη, 100% Κίνδυνος. Υγρό και αιγίο εύφλεκτο. Μπορεί να είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα. Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής. Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

Naphthol AS-D χλωροοξικό (Αρ. καταλόγου 905-10CAP)

Naphthol AS-D χλωροοξικό, 20 mg/καψάκιο.

α-ναφθουλ οξικό (Αρ. καταλόγου 906-10CAP)

Naphthol AS-D χλωροοξικό, 20 mg/καψάκιο Κίνδυνος. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο. 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.

Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3 (Αρ. καταλόγου 903C-50ML)

TRIZMA® maleate, 200 mmol/L. Προστίθεται χλωροφόρμιο ως συντηρητικό

Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6 (Αρ. καταλόγου 902C-50ML)

TRIZMA® maleate, 200 mmol/L. Προστίθεται χλωροφόρμιο ως συντηρητικό

Διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer (Αρ. καταλόγου MHS1-100ML)

Αιματοξυλίνη, πιστοποιημένη, CI 75290, 0,1% (w/v) και σταθεροποιητές

Όξινο διάλυμα αιματοξυλίνης (Αρ. καταλόγου 2852-100ML)

Αιματοξυλίνη, πιστοποιημένη, CI 75290, 1 g/L, και σταθεροποιητές, pH 3,3 στους 25 °C

Άλας Fast Blue RR (Αρ. καταλόγου FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Προζυγισμένα καψάκια. Το πραγματικό βάρος ανά καψάκιο θα ποικίλλει ανάλογα με την καθαρότητα της παρτίδας της χρωστικής και έχει βελτιστοποιηθεί μέσω δοκιμασιών.

Άλας Fast Corinth V (Αρ. καταλόγου 9015-10CAP)

Άλας Fast Corinth V, 18-22 mg/καψάκιο Κίνδυνος. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα. Επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής. Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα.

Συμπύκνωμα κιτρικού οξέος (Αρ. καταλόγου 3861-20ML)

Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών, 0,38 mol/L, pH 5,4 όταν αραιώνεται σύμφωνα με τη διαδικασία

Ειδικά υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Μεθανόλη, απλότυπη
- Ακετόνη, αντιδραστήριο ACS
- Διάλυμα φθοριούχου νατρίου (Αρ. καταλόγου 919-25ML) Φθοριούχο νάτριο, 2 g/dL

Φύλαξη και σταθερότητα

Το διμεθυλοφορμαμίδιο, ο μονομεθυλαιθέρας αιθυλενογλυκόλης, το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3, το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6, το διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer και το διάλυμα οξικής αιματοξυλίνης φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C).

Το Naphthol AS-D χλωροοξικό, το α-ναφθουλ οξικό και το άλας Fast Blue RR φυλάσσονται σε θερμοκρασία κάτω των 0 °C.

Το άλας Fast Corinth V και το κιτρικό συμπύκνωμα φυλάσσονται σε ψυγείο (2–8 °C).

Το Naphthol AS-D χλωροοξικό, το α-ναφθουλ οξικό, το άλας Fast Blue RR και το άλας Fast Corinth V είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Το αραιωμένο κιτρικό διάλυμα είναι σταθερό για 1 εβδομάδα, εάν φυλάσσεται με το καπάκι ερμητικά κλειστό σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C).

Το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3, το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6 και το κιτρικό συμπύκνωμα είναι κατάλληλα για χρήση απουσία μικροβιακής ανάπτυξης.

Φθοριούχο νάτριο, 2 g/dL. Φυλάσσετε σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Χρησιμοποιείται εάν εκτελείται «διαδικασία α-ναφθουλ οξικής εστεράσης με αναστολή φθορίου».

Αλλοίωση

Απορρίψτε το διμεθυλοφορμαμίδιο και τον μονομεθυλαιθέρα αιθυλενογλυκόλης εάν είναι χρωματισμένα ή θολά.

Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα TRIZMAL™ 6.3 και το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα TRIZMAL™ 7.6 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μία φορά και στη συνέχεια να απορρίπτονται.

Απορρίψτε το διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer και το όξινο διάλυμα αιματοξυλίνης, όταν ο χρόνος που απαιτείται για την κατάλληλη χρώση υπερβαίνει τον συνιστώμενο χρόνο της διαδικασίας κατά περισσότερα από 5 λεπτά.

Παρασκευή

Το διάλυμα Naphthol AS-D χλωροοξικό παρασκευάζεται διαλύοντας το περιεχόμενο 1 καψακίου Naphthol AS-D χλωροοξικού σε 2 mL διμεθυλοφορμαμιδίου. Αφαιρέστε 1 καψάκιο από τον καταψύκτη, εάν χρειάζεται. Προετοιμάστε αμέσως πριν από τη χρήση.

Το διάλυμα α-ναφθουλ οξικού παρασκευάζεται διαλύοντας το περιεχόμενο 1 καψακίου α-ναφθουλ οξικού σε 2 mL μονομεθυλαιθέρα αιθυλενογλυκόλης. Αφαιρέστε 1 καψάκιο από τον καταψύκτη, εάν χρειάζεται. Προετοιμάστε αμέσως πριν από τη χρήση.

Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα TRIZMAL™ 6.3 παρασκευάζεται αραιώνοντας 1 μέρος συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3 με 9 μέρη αποιονισμένου νερού. Το pH πρέπει να είναι 6,3 στους 25 °C.

Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα TRIZMAL™ 7.6 παρασκευάζεται αραιώνοντας 1 μέρος συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6 με 9 μέρη αποιονισμένου νερού. Το pH πρέπει να είναι 7,6 στους 25 °C.

Το διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer και το όξινο διάλυμα αιματοξυλίνης θα πρέπει να φιλτράρονται πριν από τη χρήση.

Το αραιωμένο κιτρικό διάλυμα παρασκευάζεται αραιώνοντας 1 μέρος συμπυκνώματος κιτρικού με 9 μέρη αποιονισμένου νερού. pH 5,4 όταν αραιώνεται.

Μονιμοποιητικό κιτρικού-ακετόνης-μεθανόλης: Σε 18 mL αραιωμένου κιτρικού διαλύματος, προσθέστε 27 mL ακετόνης καθαρότητας ACS και 5 mL μεθανόλης. Φυλάσσετε με το καπάκι ερμητικά κλειστό σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Απορρίψτε μετά από 8 ώρες.

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 συνήθειες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό εργαστηριακών αντιδραστηρίων. Απορρίψτε τα απόβλητα πρώτων 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 φιλμ 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 χρησιμοποιηθεί ως αντιπηκτικό.⁹ Κατεψυγμένοι και εγκλεισμένοι σε παραφίνη 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 φιλμ 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.^{5,9} Μην αποστέλλετε πλήρες αίμα για ανάλυση σε άλλα εργαστήρια. Αποστέλλετε μονιμοποιημένες ή μη μονιμοποιημένες αντικειμενοφόρους. Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να διατηρούνται δροσερές κατά τη μεταφορά. Αφίστε τα φιλμ να στεγνώσουν τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη μονιμοποίηση.

Σημειώσεις

Οι περιγραφόμενες διαδικασίες εκτελούνται στους 37 °C. Εάν τα αντιδραστήρια δεν βρίσκονται σε αυτή τη θερμοκρασία, μπορεί να προκύψουν ασθενείς ή αρνητικές αντιδράσεις. Συνιστάται ο έλεγχος της θερμοκρασίας με ένα θερμόμετρο ακριβείας. Τα υδατόλουτρα ελεγχόμενης θερμοκρασίας είναι πιο αποτελεσματικά από τους επωαστήρες θερμού 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 αραιωμένο λευκαντικό και κατόπιν το ξέπλυμα με άφθονες ποσότητες αποιονισμένου νερού θα αποτρέψει την επίδραση του απορρυπαντικού στα κυτταρικά ένζυμα.

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

Διαδικασίες

Διαδικασία Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης

1. Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους για 1 λεπτό σε μονιμοποιητικό κιτρικού-ακετόνης-μεθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C).
2. Πλύνετε καλά σε αποιονισμένο νερό και στεγνώστε στον αέρα για τουλάχιστον 20 λεπτά.
3. Σε 50 mL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3, προθερμασμένου στους 37 °C, προσθέστε με συνεχή ανάδευση το περιεχόμενο 1 καψακίου άλατος Fast Corinth V.
4. Όταν το άλας διαλυθεί πλήρως στο ρυθμιστικό διάλυμα, προσθέστε 2 mL διαλύματος Naphthol AS-D χλωροοξικού. Το διάλυμα θα φαίνεται αρκετά θολό.
5. Συνεχίστε την ανάμειξη για 15–30 δευτερόλεπτα και μετά προσθέστε στο δοχείο Corlin. ΜΗ ΦΙΛΤΡΑΠΕΤΕ.
6. Τοποθετήστε τα δείγματα στο διάλυμα χρώσης (από το βήμα 5) και επώστε στους 37 °C για 5 λεπτά.
7. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΣΤΕ ΑΠΟ ΤΟ ΦΩΣ. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από τη χρώση και πλύνετε τις σε αποιονισμένο νερό για 3 λεπτά. Απορρίψτε το διάλυμα χρώσης.

- 8. Εάν είναι επιθυμητό, πραγματοποιήστε αντίχρωση σε διάλυμα όξινης αιματοξυλίνης για 5–10 λεπτά και πλύνετε με νερό βρύσης.
- 9. Στεγνώστε τις αντικειμενοφόρους στον αέρα και εξετάστε τις μικροσκοπικά. Εάν απαιτείται κάλυψη με καλυπτρίδα, χρησιμοποιήστε μόνο υδατικά μέσα κάλυψης.

Διαδικασία α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης

- 1. Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους σε μονιμοποιητικό κιττικού-ακετόνης-μεθανόλης για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C).
- 2. Πλύνετε καλά σε απιονισμένο νερό και στεγνώστε στον αέρα για τουλάχιστον 20 λεπτά.
- 3. Σε 50 mL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6, προθερμασμένου στους 37 °C, προσθέστε με συνεχή ανάδευση το περιεχόμενο 1 καψακίου άλατος Fast Blue RR.
- 4. Όταν το άλας διαλυθεί πλήρως στο ρυθμιστικό διάλυμα, προσθέστε 2 mL διαλύματος α-ναφθουλ οξικού. Το διάλυμα θα είναι κίτρινο και ελαφρώς θολό.
- 5. Συνεχίστε την ανάδευση για 15–20 δευτερόλεπτα και μετά προσθέστε στο δοχείο Corlin. ΜΗ ΦΙΛΤΡΑΡΕΤΕ.
- 6. Τοποθετήστε τα δείγματα στο διάλυμα χρώσης (από το Βήμα 5) και επώαστε στους 37 °C για 30 λεπτά. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΣΤΕ ΑΠΟ ΤΟ ΦΩΣ.
- 7. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από τη χρώση και πλύνετε τις για 3 λεπτά σε απιονισμένο νερό. Απορρίψτε το διάλυμα χρώσης.
- 8. Εάν είναι επιθυμητό, πραγματοποιήστε αντίχρωση για 5–10 λεπτά σε διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer και πλύνετε με νερό βρύσης.
- 9. Στεγνώστε τις αντικειμενοφόρους στον αέρα και εξετάστε τις μικροσκοπικά. Εάν απαιτείται κάλυψη με καλυπτρίδα, χρησιμοποιήστε μόνο υδατικά μέσα κάλυψης.

Διαδικασία εστεράσης διπλής χρώσης

- 1. Εκτελέστε τη δοκιμή α-ναφθουλ-οξικής εστεράσης όπως περιγράφεται στη Διαδικασία. Μην πραγματοποιείτε αντίχρωση.
- 2. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους για 5 λεπτά σε απιονισμένο νερό.
- 3. Εκτελέστε τη δοκιμή Naphthol AS-D χλωροοξικής εστεράσης όπως περιγράφεται στα Βήματα 3-9 της Διαδικασίας.

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.⁵ Για να διαφοροποιηθούν οριστικά αυτά τα κύτταρα από τα μονοκύτταρα, το φθοριούχο νάτριο ενσωματώνεται στο σύστημα επώασσης. Το ένζυμο των μονοκυττάρων αδρανοποιείται παρουσία αυτής της ένωσης.¹² Η ακόλουθη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση της δοκιμής αναστολής φθορίου.

- 1. Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους σε μονιμοποιητικό κιττικού-ακετόνης-μεθανόλης για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C).
- 2. Πλύνετε καλά σε απιονισμένο νερό και στεγνώστε στον αέρα για τουλάχιστον 20 λεπτά.
- 3. Επισημάνετε 2 ποτήρια ως Α και Β και προσθέστε τα ακόλουθα:

	Ποτήρι Α	Ποτήρι Β
Προθερμασμένο στους 37 °C αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμαTRIZMAL™ 7.6	50 mL	50 mL
Προσθέστε με συνεχή ανάδευση, Fast Blue RR	1 καψάκιο*	1 καψάκιο*
Διάλυμα α-ναφθουλ οξικού	2 mL	2 mL
Διάλυμα φθοριούχου νατρίου	-	2 mL

*Περιεχόμενο 1 καψακίου

- 4. Αναμείξτε καλά και ρίξτε σε δοχεία Corlin με επισήμανση Α και Β.
- 5. Προχωρήστε όπως περιγράφεται στα Βήματα 6–9 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 μούρο 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 σε υποκειμενική ερμηνεία. 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	+

Αποτελέσματα

Naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση

Αυτό το ένζυμο θεωρείται συνήθως ειδικό για κύτταρα κοκκιοκυτταρικής καταγωγής. Τα κύτταρα πρέπει να εμφανίζουν κόκκινη κοκκίωση. Η δραστηριότητα είναι ασθενής ή απουσιάζει στα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα.

α-ναφθουλ-οξική εστεράση

Υπό τις συνθήκες της δοκιμασίας (pH 7,6), αυτό το ένζυμο ανιχνεύεται κυρίως σε μονοκύτταρα, μακροφάγα και ιστιοκύτταρα, και ουσιαστικά απουσιάζει στα κοκκιοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα πρέπει να εμφανίζουν μούρη κοκκίωση. Τα λεμφοκύτταρα μπορεί περιστασιακά να παρουσιάζουν δραστηριότητα.

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 στα φθοριούχο νάτριο.¹⁰

Εστεράση διπλής χρώσης

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

Η αναμενόμενη κυτταρική αντιδραστικότητα των δοκιμών για τη δραστηριότητα της εστεράσης συνοψίζεται στον Πίνακα II.

Πίνακας II. Κυτταροχημικές αντιδράσεις των κυττάρων του αίματος

Τύπος κυττάρου	Naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση	α-ναφθουλ-οξική εστεράση
Μυελοβλάστες	±	±
Προμυελοκύτταρα	+	±
Ουδετερόφιλα	+	—
Ηωσινόφιλα	—	—

Τύπος κυττάρου	Naphthol AS-D χλωροοξική εστεράση	α-ναφθουλ-οξική εστεράση
Βασεόφιλα	±	—
Μονοκύτταρα	—	+
Λεμφοκύτταρα	—	±
Λεμφοβλάστες	—	±
Μεγακαρυοκύτταρα	—	+
Ερυθροβλάστες	—	±
Κύτταρα πλάσματος	—	±
Μαστοκύτταρα	+	—
Τριχωτά κύτταρα	—	±
Ιστοκύτταρα	±	+

Το σύστημα αντιδραστηρίων 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 επώασσης 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 των αναλύσεων	Ευαισθησία μεταξύ των αναλύσεων
9010	Διμεθυλοφορμαμίδιο	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
9011	Μονομεθυλαιθέρας αιθυλενογλυκόλης	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
905	Naphthol AS-D χλωροοξικό	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
906	α-ναφθουλ-οξικό	Ταυτότητα	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
903C	Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 6.3	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
902C	Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος TRIZMAL™ 7.6	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
MHS1	Διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer	Πυρήνες	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
2852	Όξινο διάλυμα αιματοξυλίνης	Πυρήνες	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
FBS25	Άλας Fast Blue RR	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
9015	Άλας Fast Corinth V	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
3861	Συμπύκνωμα κιτρικού οξέος	Σημεία δραστηριότητας	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 οποιοσδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνων ή ασφάλειας.

390A:



H301 + H311 + H331 Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης, σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής.

H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.

H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.

H318 Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

H341 Ύποπτο για πρόκληση γενετικών ελαττωμάτων.

H350 Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

H410 Πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

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.

P302 + P352 + P312 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό, αν αισθανθείτε αδιαθεσία.

P304 + P340 + P311 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΙΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.

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.

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

- Beckmann H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegiers U, Winkler K: 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, Sliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
- 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, 1973.74.

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για να κάνετε μια παραγγελία, παρακαλούμε επισκεφθείτε τον ιστότοπό μας στη διεύθυνση SigmaAldrich.com. Για τεχνική εξυπηρέτηση, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη σελίδα τεχνικής εξυπηρέτησης στον ιστότοπό μας στη διεύθυνση 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 δήλωση βοηθήματος για διάγνωση μεταφέρθηκε στην προοριζόμενη χρήση. 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 ανεπιθύμητα συμβάντα. 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 δημοσίως προσβάσιμων πόρων.

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

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

Használati utasítás

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

90. sz. eljárás



Rendeltetésszerű használat

A Sigma-Aldrich naftol-AS-D-klóracetát-észteráz és α -naftil-acetát-észteráz készlet általános laboratóriumi felhasználásra szánt szövetteni festék. A naftol-AS-D-klóracetát-észteráz és α -naftil-acetát-észteráz reagensek kizárólag „*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 szövetlenyomat-preparátumokban lévő leukocitákban. A leukocita celluláris észterázok szövetteni 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 szubsztrátokra hatnak. Meghatározott reakciókörülmények között, adott észterázszubsztrátok felhasználásával lehetőség nyílik a hemopoetikus sejttípusok meghatározására. A leírt módszerek segítségével meg lehet különböztetni a granulocitákat a monocitáktól.¹⁻⁸

A vizsgálat elvégzéséhez a vér-, a csontvelőkeneteket vagy a szövetlenyomat-preparátumokat stabil diazóniumsó jelenlétében naftol-AS-D-klóracetáttal vagy α -naftil-acetáttal kell inkubálni. Az észtertekétesek enzimatisz hidrolízise naftolvegyületeket szabadít fel. Ezek kötődnek a diazóniumsóhoz, erősen festett lerakódásokat képezve az enzimaktivitás helyén.

Reagensek

Dimetil-formamid (kat. sz.: 9010-25ML)

Dimetil-formamid, 100%. Veszélyes. Tűzveszélyes folyadék és gőz. Lenyelve ártalmas lehet. Bőrrel érintkezve ártalmas. Enyhén bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Belélegezve mérgező. Károsíthatja a születendő gyermeket. Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.

Etilén-glikol-monometil-éter (kat. sz.: 9011-25ML)

2-metoxi-etanol, 100%. Veszély. Tűzveszélyes folyadék és gőz. Lenyelve ártalmas lehet. Bőrrel érintkezve ártalmas. Enyhén bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Belélegezve mérgező. Károsíthatja a termékenységet vagy a születendő gyermeket. Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.

Naftol-AS-D-klóracetát (kat. sz.: 905-10CAP)

Naftol-AS-D-klóracetát, 20 mg/kapszula

α -naftil-acetát (kat. sz.: 906-10CAP)

Naftol-AS-D-klóracetát, 20 mg/kapszula. Veszély. Súlyos szemkárosodást okoz. Védőkesztyű/ szemvédő/arcvédő használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

TRIZMAL™ 6.3 pufferkoncentrátum (kat. sz.: 903C-50ML)

TRIZMA® maleát, 200 mmol/l, tartósítószerként hozzáadott kloroformmal

TRIZMAL™ 7.6 pufferkoncentrátum (kat. sz.: 902C-50ML)

TRIZMA® maleát, 200 mmol/l, tartósítószerként hozzáadott kloroformmal

Mayer-féle hematoxiniloldat (kat. sz. MHS1-100ML)

Hematoxinil, tanúsított, C.I. 75290, 0,1% (w/v) és stabilizátorok

Savas hematoxiniloldat (kat. sz.: 2852-100ML)

Hematoxinil, tanúsított, C.I. 75290, 1 g/l és stabilizátorok; pH-érték 25 °C-on 3,3

Fast Blue RR só (kat. sz.: FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Előre lemért kapszulák. A kapszulánkénti tényleges tömeg a festék adott tételeinek tisztaságától függően változik, és azt vizsgálattal optimalizálták.

Fast Corinth V só (kat. sz.: 9015-10CAP)

Fast Corinth V só, 18–22 mg/kapszula. Veszély. Lenyelve ártalmas. Bőrrel érintkezve ártalmas. Belélegezve ártalmas. Rákot okozhat. Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat. Védőkesztyű/védőruha használata kötelező.

Citrátkoncentrátum (kat. sz.: 3861-20ML)

Citrátpuffer, 0,38 mol/l, pH-érték az eljárásnak megfelelő hígítás esetén 5,4

Szükséges, de nem biztosított speciális anyagok

- Metanol, abszolút
- Aceton, ACS-reagensminőség
- Nátrium-fluorid oldat (kat. sz.: 919-25ML). Nátrium-fluorid, 2 g/dl.

Tárolás és stabilitás

A dimetil-formamid, az etilén-glikol-monometil-éter, a TRIZMAL™ 6.3 pufferkoncentrátum, a TRIZMAL™ 7.6 pufferkoncentrátum, a Mayer-féle hematoxiniloldat és a savas hematoxiniloldat szobahőmérsékleten (18–26 °C) tárolandó.

A naftol-AS-D-klóracetátot, α -naftil-acetátot és Fast Blue RR sőt 0 °C alatt kell tárolni.

A Fast Corinth V só és citrátkoncentrátum hűtőszekrényben (2–8 °C) tárolandó.

A naftol-AS-D-klóracetát, α -naftil-acetát, Fast Blue RR só és Fast Corinth V só a címken feltüntetett lejárati időig stabil.

A hígított citrátoldat szobahőmérsékleten (18–26 °C), szorosan lezárta tárolva 1 hétig stabil.

A TRIZMAL™ 6.3 pufferkoncentrátum, a TRIZMAL™ 7.6 pufferkoncentrátum és a citrátkoncentrátum mikrobiális növekedés hiányában használható.

Nátrium-fluorid, 2 g/dl. Szobahőmérsékleten (18–26 °C) kell tárolni. Akkor használatos, ha a fluoridgátlással kiegészített α -naftil-acetát-észteráz eljárást alkalmazzák.

Bomlás

Dobja ki a dimetil-formamidot és az etilén-glikol-monometil-étert, ha azok elszíneződtek vagy zavarossá válnak.

A TRIZMAL™ 6.3 hígított pufferoldatot és a TRIZMAL™ 7.6 hígított pufferoldatot egyszer szabad használni, majd ki kell dobni.

Dobja ki a Mayer-féle és a savas hematoxiniloldatot, ha a megfelelő festési idő több mint 5 perccel meghaladja az eljárás során ajánlott időt.

Előkészítés

A naftol-AS-D-klóracetát oldat 1 db naftol-AS-D-klóracetát kapszula tartalmának 2 ml dimetil-formamidban történő feloldásával állítható elő. Igény szerint vegyen ki 1 kapszulát a fagyasztóból. Közvetlenül a felhasználás előtt készítse el.

Az α -naftil-acetát oldat 1 db α -naftil-acetát kapszula tartalmának 2 ml etilén-glikol-monometil-éterben történő feloldásával állítható elő. Igény szerint vegyen ki 1 kapszulát a fagyasztóból. Közvetlenül a felhasználás előtt készítse el.

A TRIZMAL™ 6.3 hígított pufferoldat elkészítéséhez hígítson 1 rész TRIZMAL™ 6.3 pufferkoncentrátumot 9 rész ioncserélt vízzel. A pH-értéknek 25 °C-on 6,3-nek kell lennie.

A TRIZMAL™ 7.6 hígított pufferoldat elkészítéséhez hígítson 1 rész TRIZMAL™ 7.6 pufferkoncentrátumot 9 rész ioncserélt vízzel. A pH-értéknek 25 °C-on 7,6-nek kell lennie.

A Mayer-féle hematoxiniloldatot és savas hematoxiniloldatot felhasználás előtt szűrni kell.

A hígított citrátoldat elkészítéséhez hígítson 1 rész citrátkoncentrátumot 9 rész ioncserélt vízzel. Hígítás után a pH-érték 5,4.

Citrát-aceton-metanol fixáló: Adjon 18 ml hígított citrátoldathoz 27 ml ACS-minőségű acetont és 5 ml metanolt. Szobahőmérsékleten (18–26 °C), szorosan lezárva kell tárolni. 8 óra után meg kell semmisíteni.

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 reagensek kezelése során a szokásos óvintézkedéseket kell követni. A hulladékot 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 vérkészítményt vagy szövetmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

Mind az α -naftil-acetát-észterázzal, mind a naftol-AS-D-klóracetát-észterázzal használhatók vér-, csontvelőkenetek, szövetlenyomat-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 csontvelőkenetek fixált állapotban szobahőmérsékleten (18–26 °C) több hétig, vagy fixálás nélkül több napig tárolhatók aktivitásváltozás nélkül.^{5,9} Ne szállítsa 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.

Megjegyzések

A leírt eljárásokat 37 °C-on kell elvégezni. Ha a reagensek 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 műanyagok keresztüli hőátadás, ezért üveg küvetákat kell használni.

Számos enzimrendszer kis mennyiségű tisztítószert jelenlétére érzékeny. Az üvegedények híg fehérítőszerrel történő mosásával, majd bőséges mennyiségű ioncserélt vízzel történő öblítésével megelőzhető a tisztítószerek sejtenzimre gyakorolt hatása.

Az eredmények bizonyos fókuszobjektív értelmezésén alapulnak. Az egyes laboratóriumoknak meg kell határozniuk saját normál tartományaikat.

Eljárások

Naftol-AS-D-klóracetát-észteráz eljárás

- Fixálja a tárgylemezeket 1 percig citrát-aceton-metanol fixálóban szobahőmérsékleten (18–26 °C).
- Alaposan mossa le őket ioncserélt vízzel, és legalább 20 percig hagyja őket levegőn száradni.
- 50 ml TRIZMAL™ 6.3 hígított pufferoldathoz (37 °C-RA ELŐMELEGÍTVE), állandó keverés mellett, adjon hozzá 1 kapszula Fast Corinth V sőt.
- Amikor a só teljesen feloldódott a pufferben, adjon hozzá 2 ml naftol-AS-D-klóracetát oldatot. Az oldat elég zavarosnak fog tűnni.
- Folytassa a keverést 15–30 másodpercig, majd öntse bele a küvetába. NE SZÜRJÉ.
- Helyezze a mintákat a festőoldatba (az 5. lépésből), és inkubálja őket 37 °C-on 5 percig. MEGJEGYZÉS: FÉNYTŐL VÉDVE TÁROLANDÓ.
- Távolítsa el a tárgylemezeket a festékből, és mossa őket ioncserélt vízben 3 percig. Öntse ki a festőoldatot.
- Ha szükséges, végezzen ellenfestést savas hematoxiniloldatban 5–10 percig, és mossa őket csapvízzel.
- Hagyja a tárgylemezeket levegőn megszáradni, majd vizsgálja meg őket mikroszkóppal. Ha fedőlemezelt szükséges, csak vizes fedőközeget használjon.

α-naftil-acetát-észteráz eljárás

1. Fixálja a tárgylemezeket 1 perccig citrát-aceton-metanol fixálóban szobahőmérsékleten (18–26 °C).
2. Alaposan mossa le őket ioncserélt vízzel, és legalább 20 percig hagyja őket levegőn száradni.
3. 50 ml TRIZMAL™ 7.6 hígított pufferoldathoz (37 °C-RA ELŐMELEGÍTVE), állandó keverés mellett, adjon hozzá 1 kapszula Fast Blue RR só-t.
4. Amikor a só teljesen feloldódott a pufferben, adjon hozzá 2 ml α-naftil-acetát oldatot. Az oldat sárga és enyhén zavaros lesz.
5. Folytassa a keverést 15–20 másodpercig, majd öntse bele a küvetába. NE SZÚRJE.
6. Helyezze a mintákat a festőoldatba (az 5. lépésből), és inkubálja őket 37 °C-on 30 percig. MEGJEGYZÉS: FÉNYTŐL VÉDVE TÁROLANDÓ.
7. Távolítsa el a tárgylemezeket a festékből, és mossa őket ioncserélt vízben 3 percig. Öntse ki a festőoldatot.
8. Ha szükséges, végezzen ellenfestést Mayer-féle hematoxilinoldatban 5–10 percig, és mossa őket csapvízzel.
9. Hagyja a tárgylemezeket levegőn megszáradni, majd vizsgálja meg őket mikroszkóppal. Ha fedőlemezelés szükséges, csak vizes fedőközeget használjon.

Észteráz eljárás kettős festéssel

1. Végezze el az α-naftil-acetát-észteráz tesztet az Eljárás részben leírtak szerint. Ne végezzen ellenfestést.
2. Öblítse a tárgylemezeket 5 percig ioncserélt vízzel.
3. Végezze el a naftol-AS-D-klóracetát-észteráz tesztet az Eljárás rész 3–9. lépésének megfelelően.

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 pozitívak erre az enzimre.¹¹ A limfociták és néhány érett granulocita esetenként szintén pozitív.⁹ 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.

1. Fixálja a tárgylemezeket 1 perccig citrát-aceton-metanol fixálóban szobahőmérsékleten (18–26 °C).
2. Alaposan mossa le őket ioncserélt vízzel, és legalább 20 percig hagyja őket levegőn száradni.
3. Címkezzon fel 2 A és B főzőpoharat, és adja hozzá a következőket:

	A főzőpohár	B főzőpohár
Előmelegített 37°C-os TRIZMAL™ 7.6 hígított puffer	50 ml	50 ml
Hozzáadás folyamatos keverés mellett: Fast Blue RR	1 kapszula*	1 kapszula*
α-naftil-acetát oldat	2 ml	2 ml
Nátrium-fluorid oldat	-	2 ml

* 1 kapszula tartalma

4. Alaposan keverje össze, és öntse egy-egy A és B jelzésű küvetába.
5. Végezze el az α-naftil-acetát-észteráz tesztet az Eljárás rész 6–9. 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 élénkörös szemcsékként, az α-naftil-acetát-észteráz aktivitásának helyei pedig fekete szemcsékként jelennek meg. Az adott sejttípus 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.

1. táblázat Pontozási jellemzők

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

Eredmények

Naftol-AS-D-klóracetát-észteráz

Ezt az enzimet általában a granulocitikus sejtvonal sejteire specifikusnak tekintik. A sejtek vörös szemcséztséget kell, hogy mutassanak. Monocitákban és limfocitákban az aktivitás gyenge vagy nincs.

α-naftil-acetát-észteráz

Vizsgálati körülmények között (pH: 7,6) ez az enzim elsősorban a monocitákban, a makrofágokban és a hisztiocitákban mutatható ki, és gyakorlatilag hiányzik a granulocitákból. A monocitáknak fekete szemcséztséget kell mutatniuk. A limfociták esetenként mutathatnak aktivitást.

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

Észteráz eljárás kettős festéssel

A kettős festési eljárás során nyert minták vörös szemcséztséggel jelenítik meg a granulocitákat és fekete szemcséztséggel a monocitákat.

Az észterázaktivitási vizsgálatok várható sejtreaktivitását a II. táblázat foglalja össze.

II. táblázat A vérsejtek citokémiai reakciói

Sejttípus	Naftol-AS-D-klóracetát-észteráz	α-naftil-acetát-észteráz
Mieloblasztok	±	±
Promielociták	+	±
Neutrofil sejtek	+	—
Eozinofil sejtek	—	—
Bazofil sejtek	±	—
Monociták	—	+
Limfociták	—	±
Limfoblasztok	—	±
Megakariociták	—	+
Eritoblasztok	—	±
Plazmasejtek	—	±
Hízósejtek	+	—
Hajas sejtek	—	±
Hisztiociták	±	+

A reagensrendszer 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, specificitást és ismételtelhetőséget igazoltak.

Kat. sz.	Termékleírás	Cél	Tesztben belüli specificitás	Tesztben belüli érzékenység	Tesztek közötti specificitás	Tesztek közötti érzékenység
9010	Dimetil-formamid	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
9011	Etilén-glikol-monometil-éter	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
905	Naftol-AS-D-klóracetát	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
906	α-naftil-acetát	Azonosság	3/3	3/3	3/3	3/3
903C	TRIZMAL™ 6.3 pufferkoncentrárum	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
902C	TRIZMAL™ 7.6 pufferkoncentrárum	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
MHS1	Mayer-féle hematoxilinoldat	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3
2852	Savas hematoxilinoldat	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3
FBS25	Fast Blue RR só	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
9015	Fast Corinth V só	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
3861	Citrátkoncentrárum	Aktivitás helye	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Lenyelve, bőrrel érintkezve vagy belélegezve mérgező.

H315 Bőrirritáló hatású.

H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.

H318 Súlyos szemkárosodást okoz.

H341 Feltehetően genetikai károsodást okoz.

H350 Rákot okozhat.

H410 Nagyon mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

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.

P302 + P352 + P312 HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel. Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.

P304 + P340 + P311 BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.

P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

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 Közösségben/ 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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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, Sliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
- 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, 1973.74.

Elérhetőségek

Megrendelés leadásához látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Műszaki segítségért látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com/techservice](https://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 rendeltetészerű használat és az óvintézkedések részekben. A diagnosztizhoz nyújtott segítségről szóló nyilatkozat áthelyezése a rendeltetészerű használatához. A rendeltetészerű használatra vonatkozó részek átdolgozása az IVDR irányelveknek való megfelelés érdekében. Az Anyagbiztonsági adatlap frissítése Biztonsági adatlapra. 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. 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
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Az „M” kezdbetűt és 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 érhetők el.

Návod k použití

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

Postup č. 90



Určené použití

Soupravy Sigma-Aldrich Naphthol AS-D Chloroacetátová esteráza a α -naftylacetátová esteráza jsou určeny jako histologické barvivo pro všeobecné laboratorní použití. Reagencie pro chloroacetát esterázu Naphthol 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 zřejmě zastupují řadu různých enzymů působících na vybrané substráty. Za definovaných reakčních podmínek může být možné určit typy hemopoetických buněk za použití specifických substrátů esterázy. Popsané metody poskytují prostředky k rozlišení granulocytů od monocytů.¹⁻⁸

K provedení testu se inkubují nátěry krve či kostní dřevě nebo tkáňové preparáty buď pomocí naftol AS-D chloroacetátu, nebo pomocí α -naftylacetátu za přítomnosti stabilní 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.

Činidla

Dimethylformamid (kat. č. 9010-25ML)

Dimethylformamid, 100% Nebezpečí. Hořlavá kapalina a pára. Může být zdraví škodlivý při požití. Zdraví škodlivý při styku s kůží. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Toxický při vdechování. Může poškodit nenarozené dítě. Před použitím si přečtěte zvláštní návod.

Ethylenglykol monomethylether (kat. č. 9011-25ML)

2-Methoxyethanol, 100% Nebezpečí. Hořlavá kapalina a pára. Může být zdraví škodlivý při požití. Zdraví škodlivý při styku s kůží. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Toxický při vdechování. Může poškodit plodnost nebo nenarozené dítě. Před použitím si přečtěte zvláštní návod.

Naftol AS-D chloroacetát (kat. č. 905-10CAP)

Naftol AS-D chloroacetát, 20 mg/tob.

α -naftylacetát (kat. č. 906-10CAP)

Naftol AS-D chloroacetát, 20 mg/tob. Nebezpečí. Způsobuje vážné poškození očí. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměňte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyměnit. Pokračujte ve vyplachování.

Pufrační koncentrát TRIZMAL™ 6.3 (kat. č. 903C-50ML)

TRIZMA® maleát, 200 mmol/l, chloroform přidaný jako konzervační přísada

Pufrační koncentrát TRIZMAL™ 7.6 (kat. č. 902C-50ML)

TRIZMA® maleát, 200 mmol/l, chloroform přidaný jako konzervační přísada

Roztok hematoxylinu podle Mayera (kat. č. MHS1-100ML)

Hematoxylin, certifikovaný, CI 75290, 0,1% (m/v), a stabilizátory

Roztok kyselého hematoxylinu (kat. č. 2852-100ML)

Hematoxylin, certifikovaný, CI 75290, 1 g/l, a stabilizátory, pH 3,3 při 25 °C

Sůl Fast Blue RR (kat. č. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Předvážené tobolky. Skutečná hmotnost jedné tobolky se bude lišit podle čistoty šarže barviva a byla optimalizována na základě testu.

Sůl Fast Blue Corinth V (kat. č. 9015-10CAP)

Sůl Fast Blue Corinth V, 18–22 mg/tob. Nebezpečí. Zdraví škodlivý při požití. Zdraví škodlivý při styku s kůží. Zdraví škodlivý při vdechování. Může způsobit rakovinu. Před použitím si přečtěte zvláštní návod. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv.

Koncentrát citrátu (kat. č. 3861-20ML)

Citrátový pufr, 0,38 mol/l, pH 5,4 po zředění podle postupu

Potřebné speciální materiály, které nejsou součástí dodávky

- Methanol, absolutní
- Aceton, ACS činidlo
- Roztok fluoridu sodného (kat. č. 919-25ML) Fluorid sodný, 2 g/dl

Skladování a stabilita

Dimethylformamid, ethylenglykol monomethylether, pufrační koncentrát TRIZMAL™ 6.3, pufrační koncentrát TRIZMAL™ 7.6, roztok hematoxylinu podle Mayera a roztok kyselého hematoxylinu se uchovávají při pokojové teplotě (18–26 °C).

Naftol AS-D chloroacetát, α -naftylacetát a sůl Fast Blue RR se uchovávají při teplotě do 0 °C.

Sůl Fast Blue Corinth V a koncentrát citrátu se uchovávají v chladničce (2–8 °C).

Naftol AS-D chloroacetát, α -naftylacetát, sůl Fast Blue RR a sůl Fast Blue Corinth V jsou stabilní až do data spotřeby uvedeného na štítcích.

Zředěný roztok citrátu je stabilní po dobu 1 týdne, pokud je uchováván pevně uzavřený při pokojové teplotě (18–26 °C).

Pufrační koncentrát TRIZMAL™ 6.3, pufrační koncentrát TRIZMAL™ 7.6 a koncentrát citrátu jsou vhodné pro použití, pokud nedochází k mikrobiálnímu růstu.

Fluorid sodný, 2 g/dl. Uchovávejte při pokojové teplotě (18–26 °C). Používá se, pokud je proveden „postup prokázání α -naftylacetát esterázy s inhibicí fluoridů“.

Znehodnocení

Dimethylformamid a ethylenglykol monomethylether zlikvidujte, pokud jsou zabarvené nebo zakalené.

Zředěný pufrační roztok TRIZMAL™ 6.3 a zředěný pufrační roztok TRIZMAL™ 7.6 je nutné použít jednou a poté zlikvidovat.

Pokud doba nezbytná pro vhodné zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 5 minut, roztok kyselého hematoxylinu dle Mayera a roztok kyselého hematoxylinu zlikvidujte.

Příprava

Roztok naftol AS-D chloroacetátu se připraví rozpuštěním obsahu 1 tobolky naftol AS-D chloroacetátu ve 2 ml dimethylformamidu. Podle potřeby vyjměte 1 tobolku z mrazničky. Připravte bezprostředně před použitím.

Roztok α -naftylacetátu se připraví rozpuštěním obsahu 1 tobolky α -naftylacetátu ve 2 ml ethylenglykol monomethyletheru. Podle potřeby vyjměte 1 tobolku z mrazničky. Připravte bezprostředně před použitím.

Zředěný pufrační roztok TRIZMAL™ 6.3 se připraví zředěním 1 dílu pufračního koncentráту TRIZMAL™ 6.3 9 díly deionizované vody. pH by mělo být 6,3 při 25 °C.

Zředěný pufrační roztok TRIZMAL™ 7.6 se připraví zředěním 1 dílu pufračního koncentráту TRIZMAL™ 7.6 9 díly deionizované vody. pH by mělo být 7,6 při 25 °C.

Roztok hematoxylinu podle Mayera a roztok kyselého hematoxylinu se před použitím přefiltrují.

Zředěný roztok citrátu se připraví zředěním 1 dílu koncentráту citrátu 9 díly deionizované vody. pH při ředění je 5,4.

Fixační prostředek citrát-aceton-methanol: Do 18 ml zředěného roztoku citrátu přidejte 27 ml acetonu čistoty ACS a 5 ml methanolu. Uchovávejte pevně uzavřený při pokojové teplotě (18–26 °C). Po 8 hodinách zlikvidujte.

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 dostatečně pro rozlišení barev a různých objektů pod mikroskopem.

Při zacházení s laboratorními činnidly 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 chloroacetát 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 parafinu 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 znatelné změny aktivity.^{5,9} Neodesilejte celou krev k vyšetření do jiných laboratorí. Posílejte fixovanou nebo nefixovanou skříčka. Skříčka by měla být během přepravy uchovávána v chladu. Nechejte nátěry uschnout nejméně 1 hodinu před fixací.

Poznámky

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 toplovzdušné 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 skleněného nádobí ředěným bělilem, následované opláchnutím velkým množstvím deionizované vody, zabrání působení detergentu na buněčné enzymy.

Výsledky jsou založeny na určitém stupni subjektivní interpretace. Jednotlivé laboratoře by si měly stanovit vlastní normální rozmezí.

Postupy

Postup pro naftol AS-D chloroacetát esterázu

- Zafixujte skříčka po dobu 1 minuty ve fixačním prostředku citrát-aceton-methanol při pokojové teplotě (18–26 °C).
- Důkladně omyjte v deionizované vodě a osušte na vzduchu po dobu nejméně 20 minut.
- Do 50 ml zředěného pufračního roztoku TRIZMAL™ 6.3, předeřátého na 37 °C, přidejte za stálého míchání obsah 1 tobolky soli Fast Blue Corinth V.
- Po úplném rozpuštění soli v pufru přidejte 2 ml roztoku naftol AS-D chloroacetátu. Roztok bude vypadat docela zakalený.
- Pokračujte v míchání po dobu 15–30 sekund a poté přidejte do Coplinovy nádoby. NEFILTRUJTE.
- Dejte vzorky do barvicího roztoku (z kroku 5) a 5 minut je inkubujte při teplotě 37 °C. POZNÁMKA: CHRAŇTE PŘED SVĚTLEM.
- Vyměňte skříčka z barviva a omyjte v deionizované vodě po dobu 3 minut. Roztok barviva zlikvidujte.
- V případě potřeby kontrastně barvěte v roztoku kyselého hematoxylinu po dobu 5–10 minut a omyjte ve vodě z vodovodu.
- Skříčka vysušte na vzduchu a mikroskopicky je prozkoumejte. Pokud je vyžadováno krycí skříčko, používejte pouze vodné montážní médium.

Postup pro α -naftylacetát esterázu

- Zafixujte skříčka po dobu 1 minuty ve fixačním prostředku citrát-aceton-methanol při pokojové teplotě (18–26 °C).
- Důkladně omyjte v deionizované vodě a osušte na vzduchu po dobu nejméně 20 minut.
- Do 50 ml zředěného pufračního roztoku TRIZMAL™ 7.6, předeřátého na 37 °C, přidejte za stálého míchání obsah 1 tobolky soli Fast Blue RR.
- Po úplném rozpuštění soli v pufru přidejte 2 ml roztoku α -naftylacetátu. Roztok bude žlutý a mírně zakalený.
- Pokračujte v míchání po dobu 15–20 sekund a poté přidejte do Coplinovy nádoby. NEFILTRUJTE.
- Dejte vzorky do barvicího roztoku (z kroku 5) a 30 minut je inkubujte při teplotě 37 °C. POZNÁMKA: CHRAŇTE PŘED SVĚTLEM.
- Vyměňte skříčka z barviva a omyjte v deionizované vodě po dobu 3 minut. Roztok barviva zlikvidujte.
- V případě potřeby kontrastně barvěte v roztoku hematoxylinu dle Mayera po dobu 5–10 minut a omyjte ve vodě z vodovodu.
- Skříčka vysušte na vzduchu a mikroskopicky je prozkoumejte. Pokud je vyžadováno krycí skříčko, používejte pouze vodné montážní médium.

Postup dvojitého barvení esterázy

1. Proveďte test na α-naftylacetát esterázu, jak je popsáno v postupu. Neprovádějte kontrastní barvení.
2. Opláchněte sklíčka v deionizované vodě po dobu 5 minut.
3. Proveďte test na naftol AS-D chloracetát esterázu, jak je popsáno v krocích 3-9 postupu.

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.⁵ Pro jednoznačné odlišení těchto buněk od monocytů je do inkubačního systému zařazen fluorid sodný. Enzym monocytů je v přítomnosti této sloučeniny inaktivován.¹² K provedení testu inhibice fluoridů lze použít následující postup.

1. Zafixujte sklíčka po dobu 1 minuty ve fixačním prostředku citrát-aceton-methanol při pokojové teplotě (18–26 °C).
2. Důkladně omyjte v deionizované vodě a osušte na vzduchu po dobu nejméně 20 minut.
3. Označte 2 kádinky A a B a přidejte následující:

	Kádinka A	Kádinka B
Zředěný pufr TRIZMAL™ 7.6 předehřátý na 37 °C	50 ml	50 ml
Přidávejte za stálého míchání, Fast Blue RR	1 tobolka*	1 tobolka*
Roztok α-naftylacetátu	2 ml	2 ml
Roztok fluoridu sodného	-	2 ml

*Obsah 1 tobolky

4. Dobře promíchejte a nalijte do Coplinových nádob označených A a B.
5. Postupujte podle popisu v krocích 6–9 postupu pro na α-naftylacetát esterázu.

Pracovní charakteristiky

Metoda hodnocení

Naskenujte nátěr a vyberte tenkou oblast s malým počtem erytrocytů. Místa aktivity naftol AS-D-chloracetát esterázy se zobrazí jako jasné červená granulace, místa aktivity α-naftylacetát esterázy jako černá granulace. Ohodnoťte body od 0 do 4+ na základě množství a intenzity jednotlivých barviv v cytoplazmické 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	+

Výsledky

Naftol AS-D chloracetát esteráza

Tento enzym je obvykle považován za specifický pro buňky granulocytární linie. Buňky by měly vykazovat červenou granulaci. Aktivita v monocytech a lymfocytech je slabá nebo chybí.

α-naftylacetát esteráza

Za zkušebních podmínek (pH 7,6) je tento enzym detekován především v monocytech, makrofázích a histiocytech, zatímco v granulocytech prakticky chybí. Monocyty by měly vykazovat černou granulaci. Lymfocyty mohou občas vykazovat aktivitu.

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

Dvojité barvení esterázy

Vzorky odebrané během postupu dvojitého barvení prokázají granulocyty červenou granulací a monocyty černou granulací.

Očekávaná buněčná reaktivita testů na aktivitu esterázy je shrnuta v tabulce II.

Tabulka II. Cytochemické reakce krevních buněk

Typ buňky	Naftol AS-D chloracetát esteráza	α-naftylacetát esteráza
Myeloblasty	±	±
Promyelocyty	+	±
Neutrofil	+	—
Eozinofil	—	—
Bazofil	±	—
Monocyt	—	+
Lymfocyty	—	±
Lymfoblasty	—	±
Megakaryocyty	—	+
Erytroblasty	—	±
Plazmatické buňky	—	±
Žírné buňky	+	—
Vlasaté buňky	—	±
Histiocyty	±	+

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, poskytné 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
9010	Dimetylformamid	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
9011	Ethylenglykol monomethylether	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
905	Naftol AS-D chloracetát	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
906	α-naftylacetát	Identita	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
903C	Pufrační koncentrát TRIZMAL™ 6.3	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
902C	Pufrační koncentrát TRIZMAL™ 7.6	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
MHS1	Roztok hematoxylinu podle Mayera	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
2852	Roztok kyselého hematoxylinu	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
FBS25	Sůl Fast Blue RR	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
9015	Sůl Fast Corinth V	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
3861	Koncentrát citrátů	Místa aktivity	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Toxický při požití, při styku s kůží nebo při vdechnutí.

H315 Způsobuje podráždění kůže.

H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H318 Způsobuje vážné poškození očí.

H341 Podezření na genetické vady.

H350 Může způsobit rakovinu.

H410 Velmi toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky.

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.

P302 + P352 + P312 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Umyjte velkým množstvím vody. Pokud se necítíte dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ středisko / lékaře.

P304 + P340 + P311 PŘI VDECHNUTÍ: Odvedte postiženého na čerstvý vzduch a zajistěte mu pohodlné dýchání. Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.

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.

Pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné nežádoucí příhodě, nahláste to výrobcí a/nebo jeho autorizovanému zástupci a vašemu národnímu úřadu.

Definice symbolů

Symbyly 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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Kontaktní informace

Chcete-li podat objednávku, navštivte naše webové stránky na [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Technický servis naleznete na stránkách technického servisu na naší webové stránce [SigmaAldrich.com/techservice](https://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 IVD. 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. 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 operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Bruksanvisning

Leukocytt α -naftylacetate (ikke-spesifikk esterase)- og leukocytt naftol-AS-D-kloracetat (spesifikk esterase)-sett

Prosedyre nr. 90

**Tiltenkt bruk**

Sigma-Aldrich naftol-AS-D-kloracetat-esterase- og α -naftylacetat-esterase-sett er ment å være en generell histologisk fargeløsning for bruk i et laboratorium. Naftol-AS-D-kloracetat-esterase- og α -naftylacetat-esterase-reagenser er kun for profesjonell "in vitro-diagnostisk bruk". Denne manuelle, kvalitative og histokjemiske prosedyren demonstrerer naftol-AS-D-kloracetat-esterase- og α -naftylacetat-esterase-aktivitet i leukocytt i menneskeblod, benmargsfiler 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 celletyper ved bruk av spesifikke esterasesubstrater. De beskrevne metodene gir metoder for å skjelne granulocytt fra monocytter.¹⁻⁸

For å utføre testen inkuberes blod, benmargsfiler eller vevsberøringsavtrykk med enten naftol-AS-D-kloracetat eller α -naftylacetat ved tilstedeværelse av et stabilt diazoniumsalt. Enzymatisk hydrolyse av esterbindinger frigjør frie naftolforbindelser. Disse kobles til diazoniumsalt og danner sterkt fargede avsetninger på stedene med enzymaktivitet.

Reagenser

Dimetylformamid (kat.nr. 9010-25ML)

Dimetylformamid, 100 %. Fare. Brannfarlig væske og damp. Kan være farlig ved svelging. Farlig ved hudkontakt. Gir mild hudirritasjon. Gir alvorlig øyeirritasjon. Giftig ved innånding. Kan gi fosterskader. Innhent særskilt instruks før bruk.

Etylenglykol-monometyleter (kat.nr. 9011-25ML)

2-metoksyetanol, 100 %. Fare. Brannfarlig væske og damp. Kan være farlig ved svelging. Farlig ved hudkontakt. Gir mild hudirritasjon. Gir alvorlig øyeirritasjon. Giftig ved innånding. Kan skade forplantningsevnen og gi fosterskader. Innhent særskilt instruks før bruk.

Naftol-AS-D-kloracetat (kat.nr. 905-10CAP)

Naftol-AS-D-kloracetat. 20 mg/hette.

α -naftylacetat (kat.nr. 906-10CAP)

Naftol-AS-D-kloracetat. 20 mg/hette. Fare. Gir alvorlig øyeskade. Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern. VED KONTAKT MED ØYNE: Skry forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

TRIZMAL™ 6.3-bufferkonsentrat (kat.nr. 903C-50ML)

TRIZMA®-maleat, 200 mmol/l, kloroform tilsatt som konserveringsmiddel

TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat (kat.nr. 902C-50ML)

TRIZMA®-maleat, 200 mmol/l, kloroform tilsatt som konserveringsmiddel

Mayers hematoksylinløsning (kat.nr. MHS1-100ML)

Hematoksylin, sertifisert, C.I. 75290, 0,1 % (vekt/volum) og stabiliseringsmidler

Syrehematoksylinløsning (kat.nr. 2852-100ML)

Hematoksylin, sertifisert, C.I. 75290, 1 g/l og stabiliseringsmidler, pH 3,3 ved 25 °C

Fast Blue RR-salt (kat.nr. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Forhåndsveide kapsler. Den faktiske vekten til hver kapsel varierer ut fra fargestoffets renhet og har blitt optimert av analysen.

Fast Corinth V-salt (kat.nr. 9015-10CAP)

Fast Corinth V-salt, 18–22 mg/hette. Fare. Farlig ved svelging. Farlig ved hudkontakt. Farlig ved innånding. Kan forårsake kreft. Innhent særskilt instruks før bruk. Benytt vernehansker/verneklær.

Sitratkonsentrat (kat.nr. 3861-20ML)

Sitratbuffer, 0,38 mol/l, pH 5,4 ved fortynning i henhold til prosedyren

Spesielle materialer som kreves, men som ikke medfølger

- Metanol, absolutt
- Aceton, ACS-reagens
- Natriumfluoridløsning (kat.nr. 919-25ML), natriumfluorid, 2 g/dl

Oppbevaring og stabilitet

Dimetylformamid, etylenglykolmonometyleter, TRIZMAL™ 6.3-bufferkonsentrat, TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat, Mayers hematoksylinløsning og syrehematoksylinløsning, oppbevares i romtemperatur (18–26 °C).

Naftol-AS-D-kloracetat, α -naftylacetat og Fast Blue RR-salt oppbevares under 0 °C.

Fast Corinth V-salt og sitratkonsentrat oppbevares i kjøleskap (2–8 °C).

Naftol-AS-D-kloracetat, α -naftylacetat, Fast Blue RR-salt og Fast Corinth V-salt er stabile frem til utløpsdatoen som er angitt på etikettene.

Fortynnet sitratløsning er stabil i 1 uke hvis den oppbevares tett lukket i romtemperatur (18–26 °C).

TRIZMAL™ 6.3-bufferkonsentrat, TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat og sitratkonsentrat er egnet for bruk i fravær av mikrobiell vekst.

Natriumfluorid, 2 g/dl. Oppbevares i romtemperatur (18–26 °C). Brukes hvis "Prosedyre for α -naftylacetat-esterase med fluoridhemming" utføres.

Forringelse

Kast dimetylformamid og etylenglykolmonometyleter hvis de er fargede eller uklare.

TRIZMAL™ 6.3-bufferløsning fortynnet og TRIZMAL™ 7.6-bufferløsning fortynnet skal brukes én gang og deretter kastes.

Kasser Mayers hematoksylin og syrehematoksylinløsning når tiden som kreves for egnet farging overskrider tiden som er anbefalt i prosedyren med mer enn 5 minutter.

Fremstilling

Naftol-AS-D-kloracetatløsning fremstilles ved å løse opp innholdet i 1 kapsel naftol-AS-D-kloracetat i 2 ml dimetylformamid. Fjern 1 kapsel fra fryseren etter behov. Fremstill umiddelbart før bruk.

α -naftylacetatløsning fremstilles ved å løse opp innholdet av 1 kapsel α -naftylacetat i 2 ml etylenglykolmonometyleter. Fjern 1 kapsel fra fryseren etter behov. Fremstill umiddelbart før bruk.

TRIZMAL™ 6.3-bufferløsning fortynnet fremstilles ved å fortynne 1 del TRIZMAL™ 6.3-bufferkonsentrat med 9 deler avionisert vann. pH bør være 6,3 ved 25 °C.

TRIZMAL™ 7.6-bufferløsning fortynnet fremstilles ved å fortynne 1 del TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat med 9 deler avionisert vann. pH bør være 7,6 ved 25 °C.

Mayers hematoksylin og syrehematoksylinløsning bør filtreres før bruk.

Sitratfortynnet løsning fremstilles ved å fortynne 1 del sitratkonsentrat med 9 deler avionisert vann. pH 5,4 ved fortynning.

Sitrat-aceton-metanolfikseringsmiddel: I 18 ml fortynnet sitratløsning tilsetter du 27 ml aceton av ACS-kvalitet og 5 ml metanol. Oppbevares tett lukket i romtemperatur (18–26 °C). Kast etter 8 timer.

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 mikroskop og annet laboratoriestyr 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, benmargsfiler, vevsberøringsavtrykk og cytosentrifugepreparater kan brukes med både α -naftylacetat-esterase og naftol-AS-D-kloracetat-esterase. Enten EDTA eller heparin vil fungere som en antikoagulant.⁹ Frosne og parafininnstøpte vev kan brukes med naftol-AS-D-kloracetat-esterase. α -naftylacetat-esterase kan brukes med suksess på frosne vevssnitt.¹⁰ Blod- eller benmargsfiler kan oppbevares fiksert i romtemperatur (18–26 °C) i flere uker eller ufiksert i flere dager uten merkbar endring i aktivitet.^{4,8} Ikke send fullblodet til analyse på andre laboratorier. Send fikserte eller ufikserte objektglass. Objektglass bør oppbevares kjølig under transport. La filmen tørke minst 1 time før fiksering.

Merknader

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 effektive enn varmluftinkubatorer og bør brukes til enzymcytokjemiske metoder. Varmeovertøring gjennom glass er raskere enn gjennom plast, og derfor bør Coplin-beholdere av glass brukes.

Mange enzystemer er følsomme for små spor av vaskemiddel. Vasking av glass med fortynnet blekemiddel etterfulgt av skylling i rikelige mengder avionisert vann vil forhindre vaskemiddeleffekt på cellulære enzymer.

Resultatene er basert på en viss grad av subjektiv tolkning. Individuelle laboratorier bør fastsette sine egne normalområder.

Prosedyrer**Prosedyre for naftol-AS-D-kloracetat-esterase**

- Fikser objektglassene i 1 minutt i sitrat-aceton-formaldehyd-fikseringsmiddel i romtemperatur (18–26 °C).
- Vask grundig i avionisert vann og lufttørk i minst 20 minutter.
- Tilsett innholdet av én kapsel Fast Corinth V-salt i 50 ml TRIZMAL™ 6.3-bufferløsning fortynnet, FORVARMET TIL 37 °C, under konstant omrøring.
- Når saltet er fullstendig oppløst i bufferen, tilsetter du 2 ml naftol-AS-D-kloracetatløsning. Løsningen vil virke ganske uklar.
- Fortsett å blande i 15–30 sekunder og overfør deretter til Coplin-beholderen. IKKE FILTRER.
- Legg prøver i fargeløsning (fra trinn 5) og inkuber ved 37 °C i 5 minutter. MERK: BESKYTT MOT LYS.
- Fjern objektglassene fra fargen og vask dem i avionisert vann i 3 minutter. Kast fargeløsningen.
- Om ønskelig, kontrastfarg i syrehematoksylinløsning i 5–10 minutter og vask i vann fra springen.
- Lufttørk objektglassene og undersøk dem mikroskopisk. Hvis dekkglass kreves, må du kun bruke et vannholdig monteringsmedium.

Prosedyre for α -naftylacetat-esterase

- Fikser objektglassene i sitrat-aceton-formaldehyd-fikseringsmiddel i 1 minutt i romtemperatur (18–26 °C).
- Vask grundig i avionisert vann og lufttørk i minst 20 minutter.
- Tilsett innholdet av én kapsel Fast Blue RR-salt i 50 ml TRIZMAL™ 7.6-bufferløsning fortynnet, FORVARMET TIL 37 °C, under konstant omrøring.
- Når saltet er fullstendig oppløst i bufferen, tilsetter du 2 ml α -naftylacetatløsning. Løsningen vil være gul og litt uklar.
- Fortsett å røre i 15–20 sekunder og overfør deretter til Coplin-beholderen. IKKE FILTRER.
- Legg prøver i fargeløsning (fra trinn 5) og inkuber ved 37 °C i 30 minutter. MERK: BESKYTT MOT LYS.
- Fjern objektglassene fra fargen og vask dem i 3 minutter i avionisert vann. Kast fargeløsningen.
- Om ønskelig, kontrastfarg i 5–10 minutter i Mayers hematoksylinløsning og vask i vann fra springen.
- Lufttørk objektglassene og undersøk dem mikroskopisk. Hvis dekkglass kreves, må du kun bruke et vannholdig monteringsmedium.

Prosedyre for esterase med dobbel farging

- 1. Utfør α-naftylacetatetesterasetest som beskrevet i prosedyren. Skal ikke kontrastfarges.
- 2. Skyll objektglassene i 5 minutter i avionisert vann.
- 3. Utfør α-naftol-AS-D-kloracetatetesterasetesten som beskrevet i prosedyretrinn 3–9.

Prosedyre for α-naftylacetatetesterase med fluoridhemming

Selv om α-naftylacetatetesterase 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.⁵ 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.

- 1. Fikser objektglassene i sitrat-aceton-formaldehyd-fikseringsmiddel i 1 minutt i romtemperatur (18–26 °C).
- 2. Vask grundig i avionisert vann og lufttørk i minst 20 minutter.
- 3. Merk 2 begre A og B, og tilsett følgende:

	Beger A	Beger B
Forvarmet 37 °C TRIZMAL™ 7.6-fortynningsbuffer	50 ml	50 ml
Tilsett Fast Blue RR under konstant omrøring	1 kapsel*	1 kapsel*
α-naftylacetatløsning	2 ml	2 ml
Natriumfluoridløsning	-	2 ml

*Innhold i 1 kapsel

- 4. Bland godt og hell i Coplin-beholdere merket A og B.
- 5. Fortsett som beskrevet i trinn 6–9 i prosedyren for α-naftylacetatetesterase.

Ytelsesegenskaper

Skåringsmetode

Skann filmen og velg et tynt område med få erytrocytter. Steder med naftol-AS-D-kloracetatetesteraseaktivitet vises som knallrød granulering, α-naftylacetatetesterase som svart granulering. Gi vurdering fra 0 til 4+ på grunnlag av mengde og intensitet av individuelle fargestoff i cytoplasmaet til de relevante celletypene. 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	+

Resultater

Naftol-AS-D-kloracetatetesterase

Dette enzymet anses som regel å være spesifikt for granulocytiske cellelinjer. Cellene skal vise rød granulering. Aktivitet er svak eller fraværende i monocytter og lymfocytter.

α-naftylacetatetesterase

Under analyseforholdene (pH 7,6) påvises dette enzymet 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 aktivitet.

α-naftylacetatetesterase 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

Esterase med dobbel farging

Prøver tatt med den doble fargingsprosedyren viser granulocytter med rød granulering og monocytter med svart granulering.

Den forventede cellulære reaktiviteten til tester for esteraseaktivitet er oppsummert i tabell II.

Tabell II. Cytokjemiske reaksjoner av blodceller

Celletype	Naftol-AS-D-kloracetatetesterase	α-naftylacetatetesterase
Myeloblaster	±	±
Promyelocytter	+	±
Nøytrofiler	+	—
Eosinofiler	—	—
Basofiler	±	—
Monocytter	—	+
Lymfocytter	—	±
Lymfoblaster	—	±
Megakaryocytter	—	+
Erytroblaster	—	±
Plasmaceller	—	±
Mastceller	+	—
Hårceller	—	±
Histiocytter	±	+

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 monocytall ved bruk av en prosedyre med α-naftylacetatetesterase) 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 repeterbarhet.

Kat. nr.	Produkt-beskrivelse	Mål	Spesifisitet innen analyse	Følsomhet innen analyse	Spesifisitet mellom analyser	Følsomhet mellom analyser
9010	Dimetylformamid	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
9011	Etylenglykol-monometyleter	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
905	Naftol-AS-D-kloracetat	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
906	α-naftylacetat	Identitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
903C	TRIZMAL™ 6.3-bufferkonsentrat	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
902C	TRIZMAL™ 7.6-bufferkonsentrat	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
MHS1	Mayers hematok-sylinløsning	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
2852	Syrehematoksyl-in-løsning	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
FBS25	Fast Blue RR-salt	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
9015	Fast Corinth V-salt	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
3861	Sitratkonsentrat	Steder med aktivitet	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Giftig ved svelging, ved hudkontakt eller ved innånding.

H315 Irriterer huden.

H317 Kan utløse en allergisk hudreaksjon.

H318 Gir alvorlig øyeskade.

H341 Mistenkes for å kunne forårsake genetiske skader.

H350 Kan forårsake kreft.

H410 Meget giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.

P273 Unngå utslipp til miljøet.

P280 Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.

P301 + P310 VED SVELGING: Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

P302 + P352 + P312 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege ved ubehag.

P304 + P340 + P311 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

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.

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

1. Beckmann H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Kontaktinformasjon

For å legge inn en bestilling, besøk nettstedet vårt på SigmaAldrich.com. Besøk siden for teknisk service på nettstedet vårt på 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. Flyttet utsagn om diagnostisk hjelpemiddel til tiltenkt bruk. 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. 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 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. 90



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 kullanarak hemopoietik hücre tiplerinin belirlenmesi mümkün olabilir. Açıklanan yöntemler, granülositleri monositlerden ayırt etmek için araçlar sağlar.¹⁻⁸

Testi gerçekleştirmek için kan, kemik iliği filmleri veya doku dokundurma preparatları, kararlı bir diazonyum tuzunun varlığında naftol AS-D kloroasetat veya α-naftil 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.

Reaktifler

Dimetil Formamid (Kat. No. 9010-25ML)

Dimetil formamid, %100. Tehlike. Alevlenir sıvı ve buhar. Yutulması halinde zararlı olabilir.

Cilt ile teması zararlıdır. Hafif cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz tahrişine neden olur. Solunması durumunda toksiktir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir. Kullanmadan önce özel kullanma talimatlarını edinin.

Etilen Glikol Monometil Eter (Kat. No. 9011-25ML)

2-MetoksiEtanol, %100. Tehlike. Alevlenir sıvı ve buhar. Yutulması halinde zararlı olabilir.

Cilt ile teması zararlıdır. Hafif cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz tahrişine neden olur. Solunması durumunda toksiktir. Üremede veya doğmamış çocukta hasara yol açabilir. Kullanmadan önce özel kullanma talimatlarını edinin.

Naftol AS-D Kloroasetat (Kat. No. 905-10CAP)

Naftol AS-D Kloroasetat, 20 mg/kap.

α-Naftil Asetat (Kat. No. 906-10CAP)

Naftol AS-D Kloroasetat, 20 mg/kap. Tehlike. Ciddi göz hasarına neden olur. Koruyucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın. GÖZLE TEMASI DURUMUNDA: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

TRIZMAL™ 6.3 Tampon Konsantresi (Kat. No. 903C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/L, Koruyucu olarak kloroform eklenir.

TRIZMAL™ 7.6 Tampon Konsantresi (Kat. No. 902C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/L, Koruyucu olarak kloroform eklenir.

Mayer Hematoksilen Çözeltisi (Kat. No. MHS1-100ML)

Hematoksilen, sertifikalı, C.I. 75290, %0,1 (a/h) ve stabilizatörler.

Asit Hematoksilen Çözeltisi (Kat. No. 2852-100ML)

Hematoksilen sertifikalı, C.I. 75290, 1 g/L ve stabilizatörler, 25°C'de pH 3,3.

Hızlı Mavi RR Tuzu (Kat. No. FBS25-10CAP)

Hızlı Mavi, C.I. 37155. Önceden tartılmış kapsüller. Kapsül başına gerçek ağırlık, boya partisinin sağlığına göre değişecektir ve test yardımı ile optimize edilmiştir.

Hızlı Korint V Tuzu (Kat. No. 9015-10CAP)

Hızlı Korint V Tuzu, 18–22 mg/kap. Tehlike. Yutulması halinde zararlıdır. Cilt ile teması zararlıdır. Solunması halinde zararlıdır. Kansere neden olabilir. Kullanmadan önce özel kullanma talimatlarını edinin. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi giyin.

Sitrat Konsantresi (Kat. No. 3861-20ML)

Sitrat tamponu, 0,38 mol/L, prosedüre göre seyreltildiğinde pH 5,4.

Sağlanmayan Gerekli Özel Malzemeler

- Metanol, Mutlak
- Aseton, ACS Reaktifi
- Sodyum Florür Çözeltisi (Kat. No. 919-25ML) Sodyum florür, 2 g/dL

Saklama ve Stabilité

Dimetil Formamid, Etilen Glikol Monometil Eter, TRIZMAL™ 6.3 Tampon Konsantresi, TRIZMAL™ 7.6 Tampon Konsantresi, Mayer Hematoksilen Çözeltisi ve Asit Hematoksilen Çözeltisi oda sıcaklığında (18–26°C) saklanır.

Naftol AS-D Kloroasetat α-Naftil Asetat ve Hızlı Mavi RR Tuzu 0°C'nin altında saklanır.

Hızlı Korint V Tuzu ve Sitrat Konsantresi buzdolabında (2–8°C) saklanır.

Naftol AS-D Kloroasetat, α-Naftil Asetat, Hızlı Mavi RR Tuzu ve Hızlı Korint V Tuzu, etiketlerde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

Sitrat Seyreltik Çözeltisi, oda sıcaklığında (18–26°C) ağız sıkıca kapalı olarak saklanırsa 1 hafta stabildir.

TRIZMAL™ 6.3 Tampon Konsantresi, TRIZMAL™ 7.6 Tampon Konsantresi ve Sitrat Konsantresi, mikrobiyal büyümenin olmadığı durumlarda kullanıma uygundur.

Sodyum florür, 2 g/dL. Oda sıcaklığında (18–26°C) saklayın. "Florür İnhibisyonu ile α-Naftil Asetat Esteraz Prosedürü" gerçekleştirildiğinde kullanılır.

Bozulma

Renkli veya bulanıksa Dimetil Formamid ve Etilen Glikol Monometil Eteri atın.

TRIZMAL™ 6.3 Seyreltik Tampon Çözeltisi ve TRIZMAL™ 7.6 Seyreltik Tampon Çözeltisi bir kez kullanılmalı ve sonra atılmalıdır.

Uygun boyama için gereken süre prosedürde tavsiye edilen süreyi 5 dakikadan fazla aşarsa Mayer Hematoksilen ve Asit Hematoksilen Çözeltisini atın.

Hazırlama

Naftol AS-D Kloroasetat Çözeltisi, 1 kapsül Naftol AS-D Kloroasetat içeriğini 2 mL Dimetil Formamid içinde çözerek hazırların. Gerektiğinde 1 kapsülü dondurucudan çıkarın. Kullanmadan hemen önce hazırlayın.

α-Naftil Asetat Çözeltisi, 1 kapsül α-Naftil Asetat içeriğini 2 mL Etilen Glikol Monometil Eter içinde çözerek hazırların. Gerektiğinde 1 kapsülü dondurucudan çıkarın. Kullanmadan hemen önce hazırlayın.

TRIZMAL™ 6.3 Seyreltik Tampon Çözeltisi, 1 ölçü TRIZMAL™ 6.3 Tampon Konsantresini 9 ölçü deiyonize su ile seyrelterek hazırların. pH 25°C'de 6,3 olmalıdır.

TRIZMAL™ 7.6 Seyreltik Tampon Çözeltisi, 1 ölçü TRIZMAL™ 7.6 Tampon Konsantresini 9 ölçü deiyonize su ile seyrelterek hazırların. pH 25°C'de 7,6 olmalıdır.

Mayer Hematoksilen ve Asit Hematoksilen Çözeltisi kullanılmadan önce filtre edilmelidir.

Sitrat Seyreltik Çözeltisi, 1 ölçü Sitrat Konsantresini 9 ölçü deiyonize su ile seyrelterek hazırların. Seyreltildiğinde pH 5,4 olmalıdır.

Sitrat-Aseton-Metanol Fiksatif: 18 mL Sitrat Seyreltik Çözeltisine 27 mL ACS dereceli Aseton ve 5 mL Metanol ekleyin. Oda sıcaklığında (18–26°C) kapağı ağız sıkıca kapalı olarak saklayın. 8 saat sonra atın.

Önlemler

Bu kitlelerde 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 bulaştırmayacağına 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, antikoagülan görevi görecektir.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.^{5,9} Diğer laboratuvarlarda tahlil için tam kanı göndermeyin. Fiksasyonlu ve fiksasyonsuz lamın gönderin. Taşıma sırasında lamlar soğuk kalmalıdır. Fiksasyondan en az 1 saat önce filmlerin kurumasını bekleyin.

Notlar

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 ağırtıcı ile yıkanması ve ardından bol miktarda deiyonize su ile durulanması, hücresel enzimler üzerindeki deterjan etkisini önleyecektir.

Sonuçlar, belirli bir dereceye kadar subjektif yorumlamaya dayanmaktadır. Her laboratuvar kendi normal aralıklarını oluşturmalıdır.

Prosedürler

Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz Prosedürü

- Lamlara oda sıcaklığında (18–26°C) Sitrat-Aseton-Metanol Fiksatif içinde 1 dakika fiksasyon uygulayın.
- Deiyonize suda iyice yıkayın ve en az 20 dakika kurutun.
- 50 mL TRIZMAL™ 6.3 Seyreltik Tampon Çözeltisine, ÖNCEDEN 37°C'YE ISITILMIŞ, 1 kapsül Hızlı Korint V Tuzu içeriğini sürekli karıştırarak ekleyin.
- Tuz, tamponda tamamen çözündüğünde 2 mL Naftol AS-D Kloroasetat Çözeltisini ekleyin. Çözelti oldukça bulanık görünecektir.
- 15–30 saniye karıştırmaya devam edin, ardından Coplin kavanoza ekleyin. FİLTRELEMİYİN.
- Çözelti oldukça bulanık görünecektir.
- 15–30 saniye karıştırmaya devam edin, ardından Coplin kavanoza ekleyin. FİLTRELEMİYİN.
- NOT: İŞIKTAN KORUYUN.
- İstenirse Asit Hematoksilen Çözeltisinde 5–10 dakika zıt boyama yapın ve musluk suyunda yıkayın.
- Lamları kurumaya bırakın ve mikroskopik olarak inceleyin. Lamel gerekiyorsa, yalnızca sulu bir yerleştirme ortamı kullanın.

α-Naftil Asetat Esteraz Prosedürü

- Oda sıcaklığında (18–26°C) Sitrat-Aseton-Metanol Fiksatif içinde lamlara 1 dakika fiksasyon uygulayın.
- Deiyonize suda iyice yıkayın ve en az 20 dakika kurutun.
- 50 mL TRIZMAL™ 7.6 Seyreltik Tampon Çözeltisine, ÖNCEDEN 37°C'YE ISITILMIŞ, 1 kapsül Hızlı Mavi RR Tuz içeriğini sürekli karıştırarak ekleyin.
- Tuz, tamponda tamamen çözündüğünde 2 mL α-Naftil Asetat Çözeltisini ekleyin. Çözelti sarı ve hafif bulanık olacaktır.
- 15–20 saniye karıştırmaya devam edin, ardından Coplin kavanoza ekleyin. FİLTRELEMİYİN.

- Numuneleri boyama çözeltisine (Adım 5'ten) yerleştirin ve 37°C'de 30 dakika inkübe edin. NOT: IŞIKTAN KORUYUN.
- Lamları boyadan çıkarın ve deiyonize suda 3 dakika yıkayın. Boyama çözeltisini atın.
- İstenirse Mayer Hematoksilen Çözeltisinde 5–10 dakika zıt boyama yapın ve musluk suyuyla yıkayın.
- Lamları kurumaya bırakın ve mikroskopik olarak inceleyin. Lamel gerekiyorsa, yalnızca sulu bir yerleştirme ortamı kullanın.

Çift Boyama Esteraz Prosedürü

- α-Naftil Asetat Esteraz testini Prosedür bölümünde açıklandığı gibi gerçekleştirin. Zıt boyama yapmayın.
- Lamları deiyonize suda 5 dakika durulayın.
- Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz testini prosedür Adımları 3–9'da açıklandığı gibi gerçekleştirin.

Florür 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.⁵ Bu hücreleri kesin olarak monositlerden ayırt etmek için inkübasyon sistemine sodyum florür eklenir. Monosit enzimi, bu bileşiğin varlığında inaktive edilir.¹² Florür inhibisyon testini gerçekleştirmek için aşağıdaki prosedür kullanılabilir.

- Oda sıcaklığında (18–26°C) Sitrat-Aseton-Metanol Fiksatif içinde lamlara 1 dakika fiksasyon uygulayın.
- Deiyonize suda iyice yıkayın ve en az 20 dakika kurutun.
- 2 adet beheri A ve B olarak etiketleyin ve aşağıdakileri ekleyin:

	Beher A	Beher B
Önceden 37°C'ye ısıtılmış TRIZMAL™ 7.6 Seyreltik Tampon	50 mL	50 mL
Sürekli karıştırarak Hızlı Mavi RR ekleyin	1 kapsül*	1 kapsül*
α-Naftil Asetat Çözeltisi	2 mL	2 mL
Sodyum Florür Çözeltisi	-	2 mL

*1 Kapsül İçeriği

- İyice karıştırın ve A ve B etiketli Coplin kavanozlarına dökün.
- α-Naftil Asetat Esteraz Prosedür Adımları 6–9'da 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	+

Sonuçlar

Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz

Bu enzimin genellikle granülositik soydan gelen hücreler için spesifik olduğu kabul edilir. Hücreler kırmızı granülasyon göstermelidir. Monositler ve lenfositlerde aktivite zayıftır veya yoktur.

α-Naftil Asetat Esteraz

Test koşulları altında (pH 7,6) bu enzim başlıca monositlerde, makrofajlarda ve histiyositlerde saptanır ve granülositlerde hemen hemen yoktur. Monositler siyah granülasyon göstermelidir. Lenfositler bazen aktivite gösterebilir.

Florür 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

Çift Boyama Esteraz

Çift boyama prosedürüyle alınan numuneler, kırmızı granülasyonlu granülositleri ve siyah granülasyonlu monositleri gösterecektir.

Esteraz aktivitesi için testlerin beklenen hücresel reaktivitesi Tablo II'de özetlenmiştir.

Tablo II. Kan Hücrelerinin Sitokimyasal Reaksiyonları

Hücre Tipi	Naftol AS-D Kloroasetat Esteraz	α-Naftil Asetat Esteraz
Miyeloblastlar	±	±
Promiyelositler	+	±
Nötrofiller	+	—
Eozinofiller	—	—
Bazofiller	±	—
Monositler	—	+
Lenfositler	—	±
Lenfoblastlar	—	±
Megakaryositler	—	+
Eritroblastlar	—	±
Plazma Hücreleri	—	±
Mast Hücreleri	+	—
Tüylü Hücreler	—	±
Histiyositler	±	+

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	Tahsil İçİ Özgüllük	Tahsil İçİ Duyarlılık	Tahiller Arası Özgüllük	Tahiller Arası Duyarlılık
9010	Dimetil Formamid	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
9011	Etilen Glikol Monometil Eter	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
905	Naftol AS-D Kloroasetat	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
906	α-Naftil Asetat	Kimlik	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
903C	TRIZMAL™ 6.3 Tampon Konsantresi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
902C	TRIZMAL™ 7.6 Tampon Konsantresi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
MHS1	Mayer Hematoksilen Çözeltisi	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
2852	Asit Hematoksilen Çözeltisi	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
FBS25	Hızlı Mavi RR Tuzu	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
9015	Hızlı Korint V Tuzu	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
3861	Sitrat Konsantresi	Aktivite Bölgeleri	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Yutulması, cilt ile teması veya solunması halinde toksiktir.

H315 Cilt tahrişine neden olur.

H317 Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir.

H318 Ciddi göz hasarına neden olur.

H341 Genetik kusurlara neden olabilir.

H350 Kansere neden olabilir.

H410 Sudaki yaşam için uzun süreli etkiyle çok toksiktir.

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.

P302 + P352 + P312 CİLTLE TEMASI HALİNDE: Bol suyla yıkayın. Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P304 + P340 + P311 SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahatça nefes alabileceği bir durumda tutun. Bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımı sonucunda ciddi bir olay meydana gelirse, lütfen bunu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makaminize 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

1. Beckmann H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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 naftol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
8. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, s. 127–130.
9. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, s. 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, s. 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

İletişim Bilgileri

Sipariş vermek için lütfen [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com) adresinden web sitemizi ziyaret edin. Teknik Servis için lütfen [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.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. Taniya yardımcı ifadesi, kullanım amacı bölümüne aktarıldı. 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. 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 operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Käyttöohje

α-naftyyliasetaatti (epäspesifinen esteraasi)- ja naftoli-AS-D-klooriasetaatti (spesifinen esteraasi) -pakkaus leukosyyteille

Menetelmänro 90



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 -diagnostikassa. Tämä manuaalinen, kvalitatiivinen, histokemiallinen menetelmä osoittaa naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasi- ja α-naftyyliasetaattiesteraasitoiminnan ihmisen veren tai luuytimen sivelvalmisteiden tai kudoskosketusvalmisteiden leukosyyteissä. Leukosyyttiesteraasin histologinen visualisointi on ainutlaatuinen tekniikka, joka on nykylääketetieteessä yleisessä käytössä.

Solujen esteraaseja on läsnä kaikkialla, ja ne edustavat eri entsyymejä, jotka vaikuttavat tiettyihin substraatteihin. Tarkino määrätyisä reaktio-olosuhteissa on mahdollista määrittää hemopoeettisia solutyyppjeä spesifisten esteraasisubstraattien avulla. Kuvatut menetelmät tarjoavat tavan erottaa granulosyyttejä monosyyteistä.¹⁻⁴

Testin suorittamiseksi veri, luuytimen sivelvalmisteet tai kudoskosketusvalmisteet inkuboidaan joko naftoli-AS-D-klooriasetaattiin tai α-naftyyliasetaattiin, jossa on stabiili diatoniumsuluaa. Esteridosiden entsyymaattinen hydrolyysi vapauttaa vapaita naftoliyhdisteitä. Ne sidostuvat diatoniumsulolan kanssa ja muodostavat voimakkaan värisiä kertymiä alueille, joissa on entsyymitoimintaa.

Reagenssit

Dimetyyliformamidi (luettelonro 9010-25ML)

Dimetyyliformamidi, 100 %. Vaara. Syttyvä neste ja höyry. Voi olla haitallista nieltynä. Haitallista joutuessaan iholle. Ärsyttää lievästi ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. Myrkyllistä hengitettynä. Saattaa vaurioittaa sikiötä. Lue erityisohjeet ennen käyttöä.

Etyleeniglykolimonometyylieetteri (luettelonro 9011-25ML)

2-metoksietanoli, 100 %. Vaara. Syttyvä neste ja höyry. Voi olla haitallista nieltynä. Haitallista joutuessaan iholle. Ärsyttää lievästi ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. Myrkyllistä hengitettynä. Saattaa heikentää hedelmällisyyttä tai vaurioittaa sikiötä. Lue erityisohjeet ennen käyttöä.

Naftoli-AS-D-klooriasetaatti (luettelonro 905-10CAP)

Naftoli-AS-D-klooriasetaatti, 20 mg/kapseli.

α-naftyyliasetaatti (luettelonro 906-10CAP)

Naftoli-AS-D-klooriasetaatti, 20 mg/kapseli. Vaara. Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa. Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

TRIZMAL™ 6.3 -puskurikonsentraatti (luettelonro 903C-50ML)

TRIZMA®-maleaatti, 200 mmol/l. Kloroformia sisälty säilöntäaineeksi

TRIZMAL™ 7.6 -puskurikonsentraatti (luettelonro 902C-50ML)

TRIZMA®-maleaatti, 200 mmol/l. Kloroformia sisälty säilöntäaineeksi

Mayerin hematoksyliiniliuos (luettelonro MHS1-100ML)

Hematoksyliini, sertifioitu, väri-indeksi 75290, 0,1 % (w/v), ja stabilointiaineet

Hapan hematoksyliiniliuos (luettelonro 2852-100ML)

Hematoksyliini, sertifioitu, väri-indeksi 75290, 1 g/l, ja stabilointiaineet, pH 3,3 lämpötilan ollessa 25 °C

Nopea sini-RR-suola (luettelonro FBS25-10CAP)

Nopea sini, väri-indeksi 37155. Esipunnittu kapselit. Kapselin todellinen paino vaihtelee väriaineerän puhtauden mukaan, ja se on optimoitu määrityksessä.

Nopea Corinth V -suola (luettelonro 9015-10CAP)

Nopea Corinth V -suola, 18–22 mg/kapseli. Vaara. Haitallista nieltynä. Haitallista joutuessaan iholle. Haitallista hengitettynä. Saattaa aiheuttaa syöpää. Lue erityisohjeet ennen käyttöä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta.

Sitraattikonsentraatti (luettelonro 3861-20ML)

Sitraattipuskuri, 0,38 mol/l, pH 5,4, menettelyohjeiden mukaisesti laimennettuna

Tarvittavat erityismateriaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

- Metanoli, absoluuttinen
- Asetoni, ACS-reagenssi
- Natriumfluoridiliuos (luettelonro 919-25ML) Natriumfluoridi, 2 g/dl

Säilytys ja stabiilius

Dimetyyliformamidi, etyleeniglykolimonometyylieetteri, TRIZMAL™ 6.3 -puskurikonsentraatti, TRIZMAL™ 7.6 -puskurikonsentraatti, Mayerin hematoksyliiniliuos ja hapan hematoksyliiniliuos säilytetään huoneenlämmössä (18–26 °C).

Naftoli-AS-D-klooriasetaatti, α-naftyyliasetaatti ja nopea sini-RR-suola säilytetään alle 0 °C:ssa.

Nopea Corinth V -suola ja sitraattikonsentraatti säilytetään jääkaapissa (2–8 °C).

Naftoli-AS-D-klooriasetaatti, α-naftyyliasetaatti, nopea sini-RR-suola ja nopea Corinth V -suola ovat stabiileja etiketeissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Laimennettu sitraattiliuos on stabiili yhden viikon ajan, jos sitä säilytetään tiiviisti suljettuna huoneenlämmössä (18–26 °C).

TRIZMAL™ 6.3 -puskurikonsentraatti, TRIZMAL™ 7.6 -puskurikonsentraatti ja sitraattikonsentraatti soveltuvat käytettäväksi, kun mikrobikasvua ei ole.

Natriumfluoridi, 2 g/dl. Säilytettävä huoneenlämmössä (18–26 °C). Käytetään, jos suoritetaan "α-naftyyliasetaattiesteraasi fluoridi-inhibitiomenetelmällä".

Pilaantuminen

Hävitä dimetyyliformamidi ja etyleeniglykolimonometyylieetteri, jos ne ovat värillisiä tai sameita.

Laimennettu TRIZMAL™ 6.3 -puskuriliuos ja laimennettu TRIZMAL™ 7.6 -puskuriliuos on käytettävä kertaalleen ja hävitettävä sen jälkeen.

Hävitä Mayerin hematoksyliiniliuos ja hapan hematoksyliiniliuos, kun soveltuvaan värjäykseen kuluva aika ylittää menetelmässä suositellun ajan yli viidellä minuutilla.

Valmistelu

Naftoli-AS-D-klooriasetaattiliuos valmistetaan liuottamalla yhden naftoli-AS-D-klooriasetaattikapselin sisältö 2 ml:aan dimetyyliformamidia. Ota yksi kapseli pakastimesta tarvittaessa. Valmistele juuri ennen käyttöä.

α-naftyyliasetaattiliuos valmistetaan liuottamalla yhden α-naftyyliasetaattikapselin sisältö 2 ml:aan etyleeniglykolimonometyylieetteriä. Ota yksi kapseli pakastimesta tarvittaessa. Valmistele juuri ennen käyttöä.

Laimennettu TRIZMAL™ 6.3 -puskuriliuos valmistetaan laimentamalla yksi osa TRIZMAL™ 6.3 -puskurikonsentraattia yhdeksällä osalla deionisoitua vettä. pH:n tulee olla 6,3 lämpötilan ollessa 25 °C.

Laimennettu TRIZMAL™ 7.6 -puskuriliuos valmistetaan laimentamalla yksi osa TRIZMAL™ 7.6 -puskurikonsentraattia yhdeksällä osalla deionisoitua vettä. pH:n tulee olla 7,6 lämpötilan ollessa 25 °C.

Mayerin hematoksyliiniliuos ja hapan hematoksyliiniliuos on suodatettava ennen käyttöä.

Laimennettu sitraattiliuos valmistetaan laimentamalla yksi osa sitraattikonsentraattia yhdeksällä osalla deionisoitua vettä. Laimennoksen pH on 5,4.

Sitraatti-asetoni-metanolifiksatiivi: Lisää 18 ml:aan laimennettua sitraattiliuosta 27 ml ACS-laatuista asetonia ja 5 ml metanolia. Säilytä tiiviisti suljettuna huoneenlämmössä (18–26 °C). Hävitä kahdeksan tunnin kuluttua.

Varotoimet

Näiden pakkausten in vitro -diagnostiset (IVD) laitteet on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa kliinisessä laboratorioympäristössä. Nämä IVD-laitteet on tarkoitettu vain pätevien ammattihenkilöstön käyttöön. In vitro -diagnostisia Sigma-Aldrich-laitteita saa käyttää laboratoriohenkilöstö, joka on koulutettu käsittelemään mahdollisesti tartuntavaarallisia ihmisperäisiä näytteitä ja käyttämään mikroskooppjea ja muita laboratoriotarvikkeita ja jolla on riittävä värinäkö ja näöntarkkuus värien ja muiden kohteiden erottamiseen mikroskoopilla.

Normaaleja laboratorioreagenssien käsittelyyn liittyviä varoimia 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 infektioita. Siksi kaikkia verijohdannaisia ja kudosnäytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuntavaarallisia.

Verta, luuytimen sivelvalmisteita, kudoskosketusvalmisteita ja sytosentrifugivalmisteita voidaan käyttää sekä α-naftyyliasetaattiesteraasin että naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasin kanssa. Antikoagulanttina käytetään joko EDTA:ta tai hepariinia.⁹ Jäädytyttyä ja parafiiniin valettuja kudoksia voidaan käyttää naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasin kanssa. α-naftyyliasetaattiesteraasia voidaan käyttää onnistuneesti jäädytytyillä kudosleikkeillä.¹⁰ Veren tai luuytimen sivelvalmisteita voidaan säilyttää kiinnitettynä huoneenlämmössä (18–26 °C) useita viikkoja tai kiinnittämättöminä useita päiviä ilman huomattavaa muutosta toiminnassa.^{5,9} Älä lähetä kokoveta määritettäväksi toisiin laboratorioihin. Lähetä kiinnitetyjä tai kiinnittämättömiä objektilaseja. Objektilasit on pidettävä viileinä kuljetuksen aikana. Anna sivelvalmisteiden kuivua vähintään yksi tunti ennen kiinnitystä.

Huomautukset

Kuvatut menettelyt 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 lämminlimainkubaattorit, ja niitä tulisi käyttää sytokemiallisissa entsyymimenetelmissä. Lämmönsiirto 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.

Tulokset perustuvat jossain määrin subjektiiviseen tulkintaan. Yksittäisten laboratorioden määriteltävä omat normaalialueensa.

Menettelyt

Naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasimenetelmä

1. Kiinnitä objektilaseja yksi minuutti sitraatti-asetoni-metanolifiksatiivissa huoneenlämmössä (18–26 °C).
2. Pese huolellisesti deionisoidussa vedessä ja ilmakuivaa vähintään 20 minuuttia.
3. Lisää yhden nopea Corinth V -suolaa sisältävän kapselin sisältö jatkuvasti sekoittaen 50 ml:aan laimennettua TRIZMAL™ 6.3 -puskuriliuosta, JOKA ON ESILÄMMITETTY 37 °C:SEEN.
4. Kun suola on täysin liennut puskuriin, lisää 2 ml naftoli-AS-D-klooriasetaattiliuosta. Liuoksesta tulee melko samean näköinen.
5. Jatka sekoittamista 15–30 sekunnin ajan ja lisää sitten Coplin-astiaan. ÄLÄ SUODATA.
6. Aseta näytteet värjäysliuokseen (valmistettu vaiheessa 5) ja inkuboi 37 °C:ssa viiden minuutin ajan. HUOMAUTUS: SUOJATTAVA VALOLTA.
7. Poista objektilasit väriaineesta ja pese deionisoidussa vedessä kolmen minuutin ajan. Hävitä värjäysliuos.
8. Vastavärrää halutessasi happamassa hematoksyliiniliuoksessa 5–10 minuutin ajan ja pese vesijohtovedessä.
9. Anna objektilasien kuivua ja tee mikroskooppitutkimus. Jos peittäminen on tarpeen, käytä vain vesipohjaista petausainetta.

α-naftyyliasetaatiiesteraasimenetelmä

- Kiinnitä objektilaseja sitraatti-asetoni-metanolifiksatiivissa yhden minuutin ajan huoneenlämmössä (18–26 °C).
- Pese huolellisesti deionisoidussa vedessä ja ilmakeivaa vähintään 20 minuuttia.
- Lisää yhden nopeaa sini-RR-suolaa sisältävän kapselin sisältö jatkuvasti sekoittaen 50 ml:aan laimennettua TRIZMAL™ 7.6 -puskuriliuosta, JOKA ON ESILÄMMITETTY 37 °C:SEEN.
- Kun suola on täysin liennut puskuuriin, lisää 2 ml α-naftyyliasetaattiliuosta. Liukesta tulee keltainen ja hieman samea.
- Jatka sekoittamista 15–20 sekunnin ajan ja lisää sitten Coplin-astiaan. ÄLÄ SUODATA.
- Aseta näytteet värjäysliuokseen (valmistettu vaiheessa 5) ja inkuboi 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. HUOMAUTUS: SUOJATTAVA VALOLTA.
- Poista objektilasit väriaineesta ja pese kolmen minuutin ajan deionisoidussa vedessä. Hävitä värjäysliuos.
- Vastavärvää halutessasi 5–10 minuutin ajan Mayerin hematoksyliiniliuoksessa ja pese vesijohtovedessä.
- Anna objektilasien kuivua ja tee mikroskooppitutkimus. Jos peittäminen on tarpeen, käytä vain vesipohjaista petausainetta.

Kaksoisvärjäysesteraasimenetelmä

- Suorita α-naftyyliasetaatiiesteraasitesti menetelmäkuvauksen mukaisesti. Älä vastavärvää.
- Huuhtele objektilaseja viisi minuuttia deionisoidussa vedessä.
- Suorita naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasitesti menetelmäkuvauksen vaiheiden 3–9 mukaisesti.

α-naftyyliasetaatiiesteraasi fluoridi-inhibitiomenetelmällä

Vaikka α-naftyyliasetaatiiesteraasia esiintyy pääasiassa monosyyttisen linjan soluissa, kun menettely suoritetaan kuvattulla tavalla, on huomattava, että megakaryosyytit ja erytroidiset esiasteet ovat positiivisia tällä entsyymillä.¹¹ Lymfosyytit ja jotkut kypsät granulosityytit osoittavat myös satunnaista positiivisuutta.⁹ Jotta nämä solut voidaan erottaa ratkaisevasti monosyyteistä, inkubointijärjestelmään sisällytetään natriumfluoridia. Monosyyttientsyymi inaktivoituu tämän yhdisteen läsnäollessa.¹² Fluoridi-inhibitiotestin suorittamiseen voidaan käyttää seuraavaa menettelyä.

- Kiinnitä objektilaseja sitraatti-asetoni-metanolifiksatiivissa yhden minuutin ajan huoneenlämmössä (18–26 °C).
- Pese huolellisesti deionisoidussa vedessä ja ilmakeivaa vähintään 20 minuuttia.
- Merkitse kaksi dekantertilasia A ja B ja lisää seuraavat aineet:

	Dekantertilasi A	Dekantertilasi B
Esilämmitetty 37-asteinen laimennettu TRIZMAL™ 7.6 -puskuri	50 ml	50 ml
Lisää jatkuvasti sekoittaen, nopea sini-RR	1 kapseli*	1 kapseli*
α-naftyyliasetaattiliuos	2 ml	2 ml
Natriumfluoridiliuos	-	2 ml

* Yhden kapselin sisältö

- Sekoita hyvin ja kaada A- ja B-merkinnöillä varustettuihin Coplin-astioihin.
- Suorita α-naftyyliasetaatiiesteraasimenetelmän vaiheet 6–9.

Suorituskykyominaisuudet

Pisteytysmenetelmä

Skannaa siveelyvalmiste ja valitse ohut alue, jossa on vain vähän erytrosyyttejä. Naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasin toiminta-alueet näkyvät kirkaanpunaisena granulaationa, α-naftyyliasetaatiiesteraasin mustana granulaationa. Anna luokitukseksi 0–4+ vastaavien solutyypin 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	+

Tulokset

Naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasi

Tätä entsyymiä pidetään yleensä spesifisenä granulosityttisen linjan soluille. Soluissa tulisi näkyä punaista granulaatiota. Monosyyteissä ja lymfosyyteissä toiminta on heikkoa tai olematonta.

α-naftyyliasetaatiiesteraasi

Määritysolosuhteissa (pH 7,6) tätä entsyymiä havaitaan pääasiassa monosyyteissä, makrofageissa ja histiosyyteissä, ja sitä ei käytännössä esiinny granulosityteissä. Monosyyteissä tulisi näkyä mustaa granulaatiota. Lymfosyyteissä voi joskus ilmetä toimintaa.

α-naftyyliasetaatiiesteraasi fluoridi-inhibitiolla

Kaikki monosyyttisen linjan solut ovat negatiivisia entsyymitoiminnan osalta, lukuun ottamatta kudosnäytteiden erilaistuneita histiosyyttejä tai erikoistuneita makrofageja, jotka voivat myös olla resistenttejä natriumfluoridille.¹⁰

Kaksoisvärjäysesteraasi

Kaksoisvärjäysmenetelmällä otetut näytteet osoittavat granulositytit punaisella granulaatiolla ja monosyytit mustalla granulaatiolla.

Yhteenveto esteraasitoimintatestien odotetusta solureaktiivisuudesta on taulukossa II.

Taulukko II. Verisolujen sytokemialliset reaktiot

Solutyyppi	Naftoli-AS-D-klooriasetaattiesteraasi	α-naftyyliasetaatiiesteraasi
Myeloblastit	±	±
Promyelosyytit	+	—
Neutrofiilit	+	—
Eosinofiilit	—	—
Basofiilit	±	—
Monosyytit	—	+
Lymfosyytit	—	±
Lymfoblastit	—	±
Megakaryosyytit	—	+
Erytroblastit	—	±
Plasmasolut	—	±
Mastsolut	+	—
Karvasolut	—	±
Histiosyytit	±	+

Reagensijärjestelmää on valvottava positiivisten ja negatiivisten kontrolliojektilasien avulla. Positiiviset kontrolliojektilasit voidaan valmistaa spesifeistä solulinjoista, joiden tiedetään olevan positiivisia.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää myös antikoaguloitua verta normaaleista näytteistä (mieluiten tavallista suuremmalla monosyyttimäärällä, jos käytetään α-naftyyliasetaatiiesteraasimenetelmää). 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, näytteen 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	Määrittelyn sisäisen spesifisyys	Määrittelyn sisäinen herkkyys	Määrittysten välinen spesifisyys	Määrittysten välinen herkkyys
9010	Dimetyyliformamidi	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
9011	Etyleeniglykolimonomeyyliieetteri	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
905	Naftoli-AS-D-klooriasetaatti	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
906	α-naftyyliasetaatii	Identiteetti	3/3	3/3	3/3	3/3
903C	TRIZMAL™ 6.3 -puskurikonsentraatti	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
902C	TRIZMAL™ 7.6 -puskurikonsentraatti	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
MHS1	Mayerin hematoksyliiniliuos	Turnat	3/3	3/3	3/3	3/3
2852	Hapan hematoksyliiniliuos	Turnat	3/3	3/3	3/3	3/3
FBS25	Nopea sini-RR-suola	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
9015	Nopea Corinth V -suola	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
3861	Sitraattikonsentraatti	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3

Varoitukset ja vaarat

Katso päivitetty riski-, vaara- ja turvallisuustiedot käyttöturvallisuustiedotteesta ja tuotemerkinnöistä.

390A:



H301 + H311 + H331 Myrkyllistä nieltynä, joutuessaan iholle tai hengitettynä.

H315 Ärsyttää ihoa.

H317 Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion.

H318 Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa.

H341 Epäillään aiheuttavan perimävaurioita.

H350 Saattaa aiheuttaa syöpää.

H410 Erittäin myrkyllistä vesieläöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.

P273 Vältettävä päästämistä ympäristöön.

P280 Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

P301 + P310 JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota välittömästi yhteys MYRKYTUSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.

P302 + P352 + P312 JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOILLE: Pese runsaalla vedellä. Ota yhteys MYRKYTUSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.

P304 + P340 + P311 JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja varmista vaivaton hengitys. Ota yhteys MYRKYTUSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.

P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssi, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegiers U, Winkler K: 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, Sliegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960.
- 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, 1973.74.

Yhteystiedot

Voit tehdä tilauksen verkkosivuillamme osoitteessa [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Tekniseen palveluumme voi ottaa yhteyttä teknisen palvelun sivulla osoitteessa [SigmaAldrich.com/techservice](https://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. Lauselma 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 haittapähtumien yhteydessä käytettävät yhteystiedot. 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. 90



Beoogd gebruik

Naftol AS-D chlooracetaat esterase en α-naftylacetaat esterase-kits van Sigma-Aldrich zijn bedoeld als een algemene histologische kleurstof voor laboratoriumgebruik. Naftol AS-D chlooracetaat esterase en α-naftylacetaat esterase-reagentia zijn uitsluitend bedoeld voor professioneel 'in-vitro diagnostisch gebruik'. Deze handmatige, kwalitatieve histochemische procedure toont de naftol AS-D chlooracetaat esterase- en α-naftylacetaat esterase-activiteit aan in leukocyten van humaan bloed, beenmergfilms of 'tissue touch'-preparaten. Histologische visualisatie van cellulaire leukocyt esterasen 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 celtypes te bepalen met behulp van specifieke esterasesubstraten. De beschreven methoden bieden middelen om granulocyten van monoccyten te onderscheiden.¹⁻⁸

Om de test uit te voeren, worden bloed, beenmergfilms of 'tissue touch'-preparaten geïncubeerd met naftol AS-D-chlooracetaat of α-naftylacetaat in aanwezigheid van een stabiel 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.

Reagentia

Dimethylformamide (cat. nr. 9010-25ML)

Dimethylformamide, 100% Gevaar. Ontvlambare vloeistof en damp. Schadelijk bij inslikken. Schadelijk bij contact met de huid. Veroorzaakt een milde huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Giftig bij inademing. Kan het ongeboren kind schaden. Alvorens te gebruiken, de speciale aanwijzingen raadplegen.

Ethyleenglycolmonomethylether (cat. nr. 9011-25ML)

2-methoxyethanol, 100% Gevaar. Ontvlambare vloeistof en damp. Schadelijk bij inslikken. Schadelijk bij contact met de huid. Veroorzaakt een milde huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Giftig bij inademing. Kan de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden. Alvorens te gebruiken, de speciale aanwijzingen raadplegen.

Naftol AS-D chlooracetaat (cat. nr. 905-10CAP)

Naftol AS-D chlooracetaat, 20 mg/cap.

α-naftylacetaat (cat. nr. 906-10CAP)

Naftol AS-D chlooracetaat, 20 mg/cap. Gevaar. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/gezichtsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Blijven spoelen.

TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat (cat. nr. 903C-50ML)

TRIZMA®-maleaat, 200 mmol/L. Chloroform toegevoegd als conserveermiddel.

TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat (cat. nr. 902C-50ML)

TRIZMA®-maleaat, 200 mmol/L. Chloroform toegevoegd als conserveermiddel.

Mayers hematoxyline-oplossing (Cat. nr. MHS1-100ML)

Hematoxyline, gecertificeerd, CI 75290, 0,1% (w/w), en stabilisatoren

Zure-hematoxyline-oplossing (cat. nr. 2852-100ML)

Hematoxyline, gecertificeerd, CI 75290, 1 g/L, en stabilisatoren, pH 3,3 bij 25 °C

Fast blue RR-zout (cat. nr. FBS25-10CAP)

Fast blue, C.I. 37155. Voorgewogen capsules. Het werkelijke gewicht per capsule varieert met de zuiverheid van de kleurstofzending en is geoptimaliseerd door middel van analyse.

Fast Corinth V-zout (cat. nr. 9015-10CAP)

Fast Corinth V-zout, 18-22 mg/cap. Gevaar. Schadelijk bij inslikken. Schadelijk bij contact met de huid. Schadelijk bij inademing. Kan kanker veroorzaken. Alvorens te gebruiken, de speciale aanwijzingen raadplegen. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding.

Citraatconcentraat (cat. nr. 3861-20ML)

Citraatbuffer, 0,38 mol/L, pH 5,4 bij verdunning volgens procedure

Vereiste, maar niet meegeleverde speciale materialen

- Methanol, absoluut
- Aceton, ACS-reagens
- Natriumfluorideoplossing (cat. nr. 919-25ML) natriumfluoride, 2 g/dL

Opslag en stabiliteit

Dimethylformamide, ethyleenglycolmonomethylether, TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat, TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat, Mayer's hematoxyline-oplossing en zure-hematoxyline-oplossing worden bewaard bij kamertemperatuur (18-26 °C).

Naftol AS-D chlooracetaat, α-naftylacetaat en Fast blue RR-zout worden bewaard beneden 0 °C.

Fast Corinth V-zout en citraatconcentraat worden gekoeld bewaard (2-8 °C).

Naftol AS-D-chlooracetaat, α-naftylacetaat, Fast blue RR-zout en Fast Corinth V-zout zijn stabiel tot de houdbaarheidsdatum op de etiketten.

Verdunde citraatoplossing is 1 week stabiel mits deze goed afgesloten bij kamertemperatuur (18-26 °C) wordt bewaard.

TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat, TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat en citraatconcentraat zijn geschikt voor gebruik in afwezigheid van microbiële groei.

Natriumfluoride, 2 g/dL. Bewaar bij kamertemperatuur (18-26 °C). Wordt gebruikt als 'α-naftylacetaat esterase met fluorideremmingsprocedure' wordt uitgevoerd.

Verslechtering

Gooi dimethylformamide en ethyleenglycolmonomethylether weg als ze gekleurd of troebel zijn.

TRIZMAL™ 6.3 verdunde bufferoplossing en TRIZMAL™ 7.6 verdunde bufferoplossing moeten één keer worden gebruikt en daarna worden weggegooid.

Gooi Mayer's hematoxyline-oplossing en zure-hematoxyline-oplossing weg als de tijd voor geschikte kleuring de in de procedure aanbevolen tijd met meer dan 5 minuten overschrijdt.

Voorbereiding

Naftol AS-D chlooracetaatoplossing wordt bereid door de inhoud van 1 capsule naftol AS-D chlooracetaat op te lossen in 2 mL dimethylformamide. Haal 1 capsule uit de vriezer wanneer nodig. Bereid onmiddellijk voor gebruik.

α-naftylacetaat-oplossing wordt bereid door de inhoud van 1 capsule α-naftylacetaat op te lossen in 2 mL ethyleenglycolmonomethylether. Haal 1 capsule uit de vriezer wanneer nodig. Bereid onmiddellijk voor gebruik.

TRIZMAL™ 6.3 verdunde buffer wordt bereid door 1 deel TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat te mengen met 9 delen gede-ioniseerd water. De pH moet 6,3 zijn bij 25 °C.

TRIZMAL™ 7.6 verdunde buffer wordt bereid door 1 deel TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat te mengen met 9 delen gede-ioniseerd water. De pH moet 7,6 zijn bij 25 °C.

Mayer's hematoxyline- en zure-hematoxyline-oplossing moeten voor gebruik worden gefiltreerd.

Verdunde citraatoplossing wordt bereid door 1 deel citraatconcentraat te verdunnen met 9 delen gede-ioniseerd water. pH 5,4 bij verdunning.

Citraat-aceton-methanol-fixatief: Voeg aan 18 mL verdunde citraatoplossing 27 mL aceton van ACS-kwaliteit en 5 mL methanol toe. Bewaar goed afgesloten bij kamertemperatuur (18-26 °C). Gooi weg na 8 uur.

Voorzorgsmaatregelen

De IVD's in deze kits zijn bedoeld voor in-vitro diagnostisch 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 weefsel geen infectie overdragen. Daarom moeten alle bloedderivaten of weefselmonsters als mogelijk infectieus worden beschouwd.

Bloed, beenmergfilms, 'tissue touch'-preparaten en cytocentrifugepreparaten kunnen worden gebruikt met zowel α-naftylacetaat esterase als naftol AS-D-chlooracetaat esterase. EDTA of heparine dienen als antistollingsmiddel.⁹ Ingevroren en in paraffine ingebedde weefsels kunnen met naftol AS-D-chlooracetaat esterase worden gebruikt. α-naftylacetaat esterase kan met succes op bevroren weefselcoups worden gebruikt.¹⁰ Bloed of beenmergfilms kunnen gefixeerd bij kamertemperatuur (18-26 °C) gedurende enkele weken of niet-gefixeerd gedurende enkele dagen worden bewaard zonder merkbare verandering in activiteit.^{5,9} 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.

Opmerkingen

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 efficiënter 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.

Resultaten zijn gebaseerd op een zekere mate van subjectieve interpretatie. Individuele laboratoria moeten hun eigen normale waarden vaststellen.

Procedures

Naftol AS-D chlooracetaat esterase procedure

1. Fixeer de objectglaasjes 1 minuut in citraat-aceton-formaldehyde-fixatief bij kamertemperatuur (18-26 °C).
2. Was grondig in gede-ioniseerd water en laat minstens 20 minuten aan de lucht drogen.
3. Voeg aan 50 mL TRIZMAL™ 6.3 verdunde bufferoplossing, VOORGEWARMD OP 37 °C, onder voortdurend roeren, de inhoud van 1 capsule Fast Corinth V-zout toe.
4. Wanneer het zout volledig is opgelost in de buffer, voeg dan 2 mL naftol AS-D chlooracetaatoplossing toe. De oplossing ziet er vrij troebel uit.
5. Blijf 15-30 seconden mengen en voeg dan toe aan de Coplin-pot. NIET FILTREREN.
6. Plaats de monsters in de kleuroplossing (uit stap 5) en incubeer 5 minuten bij 37 °C. OPMERKING: BESCHERM TEGEN LICHT.
7. Neem de objectglaasjes uit de kleuroplossing en was ze 3 minuten in gede-ioniseerd water. Gooi de kleuroplossing weg.
8. Indien gewenst 5-10 minuten tegenkleuren in zure-hematoxyline-oplossing en wassen in kraanwater.
9. Laat de glaasjes aan de lucht drogen en beoordeel ze microscopisch. Als coverslippen nodig is, gebruik dan alleen een waterig inbedmiddel.

α-naftyl acetaatesterase-procedure

1. Fixeer de objectglaasjes 1 minuut in citraat-aceton-methanol-fixatief bij kamertemperatuur (18-26 °C).
2. Was grondig in gede-ioniseerd water en laat minstens 20 minuten aan de lucht drogen.
3. Voeg aan 50 mL TRIZMAL™ 7.6 verdunde bufferoplossing, VOORGEWARMD OP 37 °C, onder voortdurend roeren, de inhoud van 1 capsule Fast blue RR-zout toe.
4. Wanneer het zout volledig is opgelost in de buffer, voeg dan 2 mL α-naftolacetaat-oplossing toe. De oplossing zal geel en enigszins troebel zijn.
5. Blijf 15-20 seconden roeren voeg dan toe aan de Coplin-pot. NIET FILTREREN.
6. Plaats de monsters in de kleuroplossing (uit stap 5) en incubeer 30 minuten bij 37 °C. OPMERKING: BESCHERM TEGEN LICHT.
7. Neem de objectglaasjes uit de kleuroplossing en was ze 3 minuten in gede-ioniseerd water. Gooi de kleuroplossing weg.
8. Indien gewenst 5-10 minuten tegenkleuren in Mayer's hematoxyline-oplossing en wassen in kraanwater.
9. Laat de glaasjes aan de lucht drogen en beoordeel ze microscopisch. Als coverslippen nodig is, gebruik dan alleen een waterig inbedmiddel.

Dubbele kleuring esteraseprocedure

1. Voer de α-naftylacetaatesterase-test uit zoals beschreven in Procedure. Niet tegenkleuren.
2. Spoel de glaasjes gedurende 5 minuten in gede-ioniseerd water.
3. Voer de naftyl AS-D chlooracetaatesterase-test uit zoals beschreven in Procedure, stappen 3-9.

α-naftylacetaatesterase met fluorideremmingsprocedure

Hoewel α-naftylacetaatesterase voornamelijk wordt aangetroffen in cellen van monocytair afstamming wanneer het wordt uitgevoerd zoals beschreven, moet bekend zijn dat megakaryocyten en erythroide precursors positief zijn voor dit enzym.¹¹ Lymfocyten en sommige rijpe granulocyten vertonen ook incidentele positiviteit.¹³ 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.

1. Fixeer de objectglaasjes 1 minuut in citraat-aceton-methanol-fixatief bij kamertemperatuur (18-26 °C).
2. Was grondig in gede-ioniseerd water en laat minstens 20 minuten aan de lucht drogen.
3. Label 2 bekerglazen A en B en voeg het volgende toe:

	Bekerglas A	Bekerglas B
Voorverwarmd 37°C TRIZMAL™ 7.6 verdunde buffer	50 mL	50 mL
Voeg onder voortdurend roeren Fast blue RR toe	1 capsule*	1 capsule*
α-naftylacetaat-oplossing	2 mL	2 mL
Natriumfluoride-oplossing	-	2 mL

*Inhoud van 1 capsule

4. Meng goed en giet in Coplin-potten, gelabeld A en B.
5. Ga verder zoals beschreven in stappen 6-9 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 granulaties, α-naftylacetaatesterase als zwarte granulaties. 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 enigszins gebaseerd op 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 scores

Celscore	Kleuringsintensiteit	Interpretatie
0+	Geen	—
1+	Vaag tot matig	±
2+	Matig tot sterk	+
3+	Sterk	+
4+	Schitterend	+

Resultaten

Naftol AS-D chlooracetaatesterase

Dit enzym wordt meestal beschouwd als specifiek voor cellen van granulocytair afstamming. De cellen moeten rode granulaties vertonen. De activiteit is zwak of afwezig in monocyten en lymfocyten.

α-naftylacetaatesterase

Onder de testomstandigheden (pH 7,6) wordt dit enzym voornamelijk gedetecteerd in monocyten, macrofagen en histiocyten en is het vrijwel afwezig in granulocyten. Monocyten moeten zwarte granulaties vertonen. Lymfocyten kunnen een enkele keer activiteit vertonen.

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

Dubbele kleuring esterase

Monsters die volgens de dubbele-kleuringsprocedure zijn gekleurd, tonen granulocyten met rode granulaties en monocyten met zwarte granulaties.

De verwachte cellulaire reactiviteit van tests op esteraseactiviteit is samengevat in tabel II.

Tabel II. Cytochemische reacties van bloedcellen

Celtype	Naftol AS-D chlooracetaatesterase	α-naftylacetaatesterase
Myeloblasten	±	±
Promyelocyten	+	±
Neutrofielen	+	—
Eosinofielen	—	—
Basofielen	±	—
Monocyten	—	+
Lymfocyten	—	±
Lymfoblasten	—	±
Megakaryocyten	—	+
Erythroblasten	—	±
Plasmacellen	—	±
Mastcellen	+	—
Harige cellen	—	±
Histiocyten	±	+

Het reagenssysteem moet gecontroleerd worden met behulp van positieve- en negatieve-controle-glaasjes. Positieve-controle-glaasjes 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 patiëntglaasjes 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
9010	Dimethylformamide	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
9011	Ethyleenglycolmonomethylether	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
905	Naftol AS-D chlooracetaat	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
906	α-naftylacetaat	Identiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
903C	TRIZMAL™ 6.3-bufferconcentraat	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
902C	TRIZMAL™ 7.6-bufferconcentraat	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
MHS1	Mayers hematoxyline-oplossing	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
2852	Zure-hematoxyline-oplossing	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
FBS25	Fast Blue RR-zout	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
9015	Fast Corinth V-zout	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
3861	Citraatconcentraat	Locaties van activiteit	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Giftig bij inslikken, contact met de huid of bij inademing.

H315 Veroorzaakt huidirritatie.

H317 Kan een allergische huidreactie veroorzaken.

H318 Veroorzaakt ernstig oogletsel.

H341 Verdacht van het veroorzaken van genetische schade.

H350 Kan kanker veroorzaken.

H410 Zeer giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.

P273 Voorkom lozing in het milieu.

P280 Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming.

P301 + P310 NA INSЛИKKEN: Bel onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts.

P302 + P352 + P312 INDIEN OP DE HUID: Was met veel water. Bel een ANTIGIFCENTRUM/arts als u zich onwel voelt.

P304 + P340 + P311 NA INADEMING: Breng de persoon in de frisse lucht en zorg dat hij comfortabel kan ademen. Bel een ANTIGIFCENTRUM of een arts.

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.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 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.
6. 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.
7. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
8. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
9. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
10. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973.74.

Contactgegevens

Om een bestelling te plaatsen, bezoek onze website op [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Ga voor technische service naar de technische servicepagina op onze website: [SigmaAldrich.com/techservice](https://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. Waarschuwingen en gevaren toegevoegd. Added Warnings and Hazards. 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

De Initial M en Sigma-Aldrich zijn handelsmerken van Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland of gelieerde ondernemingen. Alle andere handelsmerken zijn eigendom van hun respectieve eigenaars. Gedetailleerde informatie over handelsmerken is beschikbaar via openbaar toegankelijke bronnen.

Sigma-Aldrich®

Navodila za uporabo

Komplet za levkocitni α -naftil acetat (nespecifična esteraza) in levkocitni naftol AS-D kloroacetat (specifična esteraza)

Postopek št. 90



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 predstavljajo vrsto različnih encimov, ki delujejo na izbrane substrate. Pod določenimi reakcijskimi pogoji je mogoče določiti vrste hemopoetskih celic z uporabo specifičnih esteraznih substratov. Opisane metode omogočajo razlikovanje med granulociti in monociti.¹⁻⁸

Za izvedbo testa se kri, filmi kostnega mozga ali tipalni tkivni preparati inkubirajo z naftol AS-D kloroacetatom ali α -naftil acetatom v prisotnosti stabilne 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.

Reagenti

Dimetilformamid (kat. št. 9010-25ML)

Dimetilformamid, 100 %. Nevarno. Vnetljiva tekočina in hlapi. V primeru zaužitja je lahko škodljivo. Zdravju škodljivo v stiku s kožo. Povzroča blago draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Strupeno v primeru vdihavanja. Lahko škoduje nerojenemu otroku. Pred uporabo pridobite posebna navodila.

Etilenglikol monometil eter (kat. št. 9011-25ML)

2-metoksietanol, 100 %. Nevarno. Vnetljiva tekočina in hlapi. V primeru zaužitja je lahko škodljivo. Zdravju škodljivo v stiku s kožo. Povzroča blago draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Strupeno v primeru vdihavanja. Lahko škoduje plodnosti ali nerojenemu otroku. Pred uporabo pridobite posebna navodila.

Naftol AS-D kloroacetat (kat. št. 905-10CAP)

Naftol AS-D kloroacetat, 20 mg/kapsulo.

α -naftil acetat (kat. št. 906-10CAP)

Naftol AS-D kloroacetat, 20 mg/kapsulo. Nevarno. Povzroča hude poškodbe oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno za oči/zaščitno za obraz. 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.

Koncentrat pufra TRIZMAL™ 6.3 (kat. št. 903C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/l, dodan je kloroform kot konzervans

Koncentrat pufra TRIZMAL™ 7.6 (kat. št. 902C-50ML)

TRIZMA® maleat, 200 mmol/l, dodan je kloroform kot konzervans

Mayerjeva raztopina hematoksilina (kat. št. MHS1-100ML)

Hematoksilin, certificiran, CI 75290, 0,1 % (m/v), in stabilizatorji

Kisla raztopina hematoksilina (kat. št. 2852-100ML)

Certificiran hematoksilin, CI 75290, 1 g/l, in stabilizatorji, pH 3,3 pri 25 °C

Sol Fast Blue RR (kat. št. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155. Predhodno stehatane kapsule. Dejanska teža na kapsulo se razlikuje glede na čistost serije barvil in je bila optimizirana z analizo.

Sol Fast Corinth V (kat. št. 9015-10CAP)

Sol Fast Corinth V, 18–22 mg/kapsulo. Nevarno. Zdravju škodljivo pri zaužitju. Zdravju škodljivo v stiku s kožo. Zdravju škodljivo pri vdihavanju. Lahko povzroči raka. Pred uporabo pridobite posebna navodila. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila.

Citratni koncentrat (kat. št. 3861-20ML)

Citratni pufer, 0,38 mol/l, pH 5,4, če je razredčen po postopku

Posebni materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi

- Metanol, absolutni
- Aceton, reagent ACS
- Raztopina natrijevega fluorida (kat. št. 919-25ML). Natrijev fluorid, 2 g/dl

Shranjevanje in stabilnost

Dimetilformamid, etilen glikol monometil eter, koncentrat pufra TRIZMAL™ 6,3, koncentrat pufra TRIZMAL™ 7,6, Mayerjeva raztopina hematoksilina in kisla raztopina hematoksilina so shranjeni pri sobni temperaturi (18–26 °C).

Naftol AS-D kloroacetat, α -naftil acetat in sol Fast Blue RR se shranjujejo pri temperaturi pod 0 °C.

Sol in citratni koncentrat Fast Corinth V hranite v hladilniku (2–8 °C).

Naftol AS-D kloroacetat, α -naftil acetat, sol Fast Blue RR in sol Fast Corinth V so stabilni do datuma izteka roka uporabnosti, navedenega na oznakah.

Citratna razredčena raztopina je obstojna 1 teden, če se hrani trdno zaprta pri sobni temperaturi (18–26 °C).

Koncentrat pufra TRIZMAL™ 6,3, koncentrat pufra TRIZMAL™ 7,6 in koncentrat citrata so primerni za uporabo v odsotnosti mikrobnе rasti.

Natrijev fluorid, 2 g/dl. Shranjujte pri sobni temperaturi (18–26 °C). Uporabi se, če se izvede »Postopek inhibicije α -naftil acetat esteraze s fluoridom«.

Poslabšanje kakovosti

Dimetilformamid in etilenglikol monometil eter zavrzite, če sta obarvana ali motna.

Raztopini TRIZMAL™ 6,3 in TRIZMAL™ 7,6 razredčenega pufra je treba enkrat uporabiti in nato zavreči.

Mayerjevo raztopino hematoksilina in kislo raztopino hematoksilina zavrzite, če je čas, potreben za ustrezno obarvanje, daljši od časa, priporočenega v postopku, za več kot 5 minut.

Prilava

Naftol AS-D kloroacetatna raztopina se pripravi tako, da se vsebina 1 kapsule naftol AS-D kloroacetat raztopi v 2 ml dimetilformamida. Po potrebi vzemite 1 kapsulo iz zamrzovalnika. Pripravite neposredno pred uporabo.

α -naftil acetatno raztopino pripravite tako, da vsebino 1 kapsule α -naftil acetata raztopite v 2 ml etilenglikol monometil etera. Po potrebi vzemite 1 kapsulo iz zamrzovalnika. Pripravite neposredno pred uporabo.

Raztopino TRIZMAL™ 6,3 razredčenega pufra pripravite tako, da 1 del koncentrata pufra TRIZMAL™ 6,3 razredčite z 9 deli deionizirane vode. pH mora biti 6,3 pri 25 °C.

Raztopino TRIZMAL™ 7,6 razredčenega pufra pripravite tako, da 1 del koncentrata pufra TRIZMAL™ 7,6 razredčite z 9 deli deionizirane vode. pH mora biti 7,6 pri 25 °C.

Mayerjevo raztopino hematoksilina in kislo raztopino hematoksilina je treba pred uporabo filtrirati.

Citratno razredčeno raztopino pripravite tako, da 1 del citratnega koncentrata razredčite z 9 deli deionizirane vode. pH je 5,4 po razredčitvi.

Citratno-aceton-metanolni fiksativ: 18 ml razredčene raztopine citrata dodajte 27 ml acetona razreda ACS in 5 ml metanola. Shranjujte trdno zaprto pri sobni temperaturi (18–26 °C). Po 8 urah zavrzite.

Previdnostni ukrepi

Izdelki IVD, ki so vključeni v te komplete, 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 tkivne preparate 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.^{5,9} Polne krvi ne pošiljajte za analizo v druge laboratorije. Pošiljite fiksirana ali nefiksirana stekelca. Stekelca je treba med prevozom hraniti na hladnem. Pred fiksacijo pustite filme, da se sušijo vsaj 1 uro.

Opombe

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.

Rezultati temeljijo na določenih stopnji subjektivne razlage. Posamezni laboratoriji morajo določiti lastna normalna območja.

Postopki

Naftol AS-D kloroacetat esterazni postopek

- Stekelca za 1 minuto fiksirajte v fiksativu citrat-aceton-metanol pri sobni temperaturi (18–26 °C).
- Temeljito sperite v deionizirani vodi in vsaj 20 minut sušite na zraku.
- V 50 ml TRIZMAL™ 6,3 razredčene puferske raztopine, PREDHODNO SEGRETE NA 37 °C, ob stalnem mešanju dodajte vsebino 1 kapsule soli Fast Corinth V.
- Ko je sol popolnoma raztopljena v pufu, dodajte 2 ml raztopine naftol AS-D kloroacetata. Raztopina bo videti precej motna.
- Nadaljujte z mešanjem 15–30 sekund, nato dodajte v kozarec Coplin. NE FILTRIRAJTE.
- Vzorce položite v raztopino za barvanje (iz koraka 5) in jih 5 minut inkubirajte pri 37 °C. OPOMBA: ZAŠČITITE PRED SVETLOBO.
- Stekelca odstranite z barvila in jih 3 minute umivajte v deionizirani vodi. Raztopino za barvanje zavrzite.
- Po želji 5–10 minut kontrastno barvajte v kisli raztopini hematoksilina in sperite z vodo iz pipe.
- Stekelca posušite na zraku in jih mikroskopsko pregledajte. Če je potrebno prekrivanje, uporabite samo vodni medij za pritrdjevanje.

Postopek z α -naftil acetat esterazo

- Stekelca 1 minuto fiksirajte v fiksativu citrat-aceton-metanol pri sobni temperaturi (18–26 °C).
- Temeljito sperite v deionizirani vodi in vsaj 20 minut sušite na zraku.
- V 50 ml razredčene puferske raztopine TRIZMAL™ 7,6, VNAPREJ SEGRETE NA 37 °C, ob stalnem mešanju dodajte vsebino 1 kapsule soli Fast Blue RR.
- Ko je sol popolnoma raztopljena v pufu, dodajte 2 ml raztopine α -naftil acetata. Raztopina bo rumena in rahlo motna.
- Nadaljujte z mešanjem 15–20 sekund, nato pa dodajte v kozarec Coplin. NE FILTRIRAJTE.
- Vzorce položite v raztopino za barvanje (iz koraka 5) in jih 30 minut inkubirajte pri 37 °C. OPOMBA: ZAŠČITITE PRED SVETLOBO.

- 7. Odstranite preparate z barvanja in jih 3 minute umivajte v deionizirani vodi. Raztopino za barvanje zavrzite.
- 8. Po želji jih 5–10 minut kontrastno barvajte v Mayerjevi raztopini hematoksilina in sperite v vodi iz pipe.
- 9. Stekelca posušite na zraku in jih mikroskopsko pregledjte. Če je potrebno prekrivanje, uporabite samo vodni medij za pritrdjevanje.

Postopek dvojnega barvanja z esterazo

- 1. Izvedite test α-naftil acetat esteraze, kot je opisano v razdelku s postopkom. Ne uporabljajte kontrastnih barvil.
- 2. Stekelca 5 minut izpirajte v deionizirani vodi.
- 3. Test naftol AS-D kloroacetatne esteraze izvedite, kot je opisano v korakih 3–9 postopka.

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 prekursorji pozitivni na ta encim.¹¹ Limfociti in nekateri zreli granulociti so prav tako občasno pozitivni.⁵ 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. Stekelca 1 minuto fiksirajte v fiksativu citrat-aceton-metanol pri sobni temperaturi (18–26 °C).
- 2. Temeljito sperite v deionizirani vodi in vsaj 20 minut sušite na zraku.
- 3. Označite 2 čaši A in B ter dodajte to:

	Čaša A	Čaša B
Razredčeni pufer TRIZMAL™ 7.6, vnaprej segret na 37 °C	50 ml	50 ml
Ob stalnem mešanju dodajte Fast Blue RR	1 kapsula*	1 kapsula*
Raztopina α-naftil acetata	2 ml	2 ml
Raztopina natrijevega fluorida	-	2 ml

* Vsečina 1 kapsule

- 4. Dobro premešajte in prelijte v kozarce Coplin z oznakama A in B.
- 5. Nadaljujte, kot je opisano v korakih 6–9 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 nekoliko na 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	+

Rezultati

Naftol AS-D kloroacetatna esteraza

Ta encim običajno velja za specifičnega za celice granulocitne linije. Na celicah mora biti vidna rdeča granulacija. V monocitih in limfocitih je aktivnost šibka ali je ni.

α-naftil acetat esteraza

V pogojih preskusa (pH 7,6) je ta encim zaznan predvsem v monocitih, makrofagih in histiocitih, v granulocitih pa ga praktično ni. Monociti bi morali imeti črno granulacijo. Limfociti lahko občasno kažejo aktivnost.

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

Esteraza z dvojnim obarvanjem

Vzorci, odvzeti s postopkom dvojnega obarvanja, pokažejo granulocite z rdečo granulacijo in monocite s črno granulacijo.

Pričakovana celična reaktivnost testov za esterazno aktivnost je povzeta v tabeli II.

Tabela II. Citokemične reakcije krvnih celic

Vrsta celice	Naftol AS-D kloroacetatna esteraza	α-naftil acetat esteraza
Mieloblasti	±	±
Promielociti	+	±
Neutrofili	+	—
Eozinofili	—	—
Bazofili	±	—
Monociti	—	+
Limfociti	—	±
Limfoblasti	—	±
Megakariociti	—	+
Eritroblasti	—	±
Plazemske celice	—	±
Mastociti	+	—
Dlakave celice	—	±
Histiociti	±	+

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
9010	Dimetilformamid	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
9011	Etilenglikol monometil eter	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
905	Naftol AS-D kloroacetat	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
906	α-naftil acetat	Identiteta	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
903C	Koncentrat pufru TRIZMAL™ 6.3	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
902C	Koncentrat pufru TRIZMAL™ 7.6	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
MHS1	Mayerjeva raztopina hematoksilina	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
2852	Kisla raztopina hematoksilina	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
FBS25	Sol Fast Blue RR	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
9015	Sol Fast Corinth V	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
3861	Koncentrat citrata	Lokacije aktivnosti	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.

390A:



H301 + H311 + H331 Strupeno pri zaužitju, stiku s kožo ali vdihavanju.

H315 Povzroča draženje kože.

H317 Lahko povzroči alergijski odziv kože.

H318 Povzroča hude poškodbe oči.

H341 Sum povzročitve genetskih okvar.

H350 Lahko povzroči raka.

H410 Zelo strupeno za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki.

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.

P302 + P352 + P312 PRI STIKU S KOŽO: Umiti z veliko vode. Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.

P304 + P340 + P311 PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.

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.

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 H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegers U, Winkler K: 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 HJ, 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, Sliogerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem* 8:200, 1960.
8. Brown BA: *IN Hematology: Principles and Procedures*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127–130.
9. Sun T: *Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms*. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38.
10. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: *IN Color Atlas of Hematological Cytology*. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111.
11. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 21:1, 1973.74.

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. Pomoč za izjavo o diagnozi je predstavljena v predvideno uporabo. Revidiran je namen uporabe za uskladištev 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. 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
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Začetna črka M in Sigma-Aldrich sta blagovni znamki družbe Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija ali njenih pridruženih družb. Vse druge blagovne znamke so last posameznih lastnikov. Podrobne informacije o blagovnih znamkah so na voljo v javno dostopnih virih.

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

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