



SIGMA-ALDRICH®

NAPHTHOL AS-D CHLORAZETAT-ESTERASE UND α -NAPHTHYLAZETAT-ESTERASE (Verfahren Nr. 91)

VERWENDUNGSZWECK

Für den zytologischen Nachweis spezifischer und nicht-spezifischer Leukozytenesterase. Die Esterase-Reagenzien dienen der „In-vitro-Diagnostik“.

Zelluläre Esterasen sind allgegenwärtig und scheinen mehrere unterschiedliche Enzyme, die auf bestimmte Substrate wirken, zu vertreten. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen können hämopoetische Zelltypen anhand spezifischer Esterasesubstrate bestimmt werden. Anhand der beschriebenen Methoden können Hämatologen und Hämatopathologen Granulozyten von Monozyten unterscheiden.¹⁻⁸

Zur Durchführung des Tests werden Blut, Knochenmarkfilme oder Abklatschpräparate entweder mit Naphthyl AS-D Chlorazetat (NCAE) oder α -Naphthylazetat (NAE) in Gegenwart eines frisch gebildeten Diazoniumsalzes inkubiert. Die enzymatische Hydrolyse von Esterverbindungen setzt freie Naphtholverbindungen frei. Diese verbinden sich mit dem Diazoniumsalz und bilden an den Enzymaktivitätsstellen Ablagerungen intensiver Färbung.

Die neuesten Verfahren, wie auch die Verfahren von Sigma-Aldrich, verwenden stabile Diazoniumsalze. Diese werden durch die Reaktion eines Arylamins mit Natriumnitrit in einem sauren Medium gebildet.⁹ Das entstandene Diazoniumchlorid (instabil) kann dann mit Verbindungen wie Zinkchlorid, Zinksulfat oder Naphthalen-1,6-Disulfonat behandelt werden, um stabile Salze zu bilden. Diese Stabilisatoren können auf einige Enzymsysteme inhibitorisch wirken, wogegen die Diazoniumchloride weniger inhibitorisch sind.⁹ Aus diesem Grund bietet Sigma-Aldrich nun stabile Lösungen für Fast Red Violet LB Standardlösung, Fast Blue BB Standardlösung und Natriumnitrit für die Esterase-Zytochemie an. Um diese Methoden noch mehr zu vereinfachen, sind ebenfalls stabile Naphthol AS-D Chlorazetat- und α -Naphthylazetat-Lösungen enthalten. Diese stabilen Lösungen ermöglichen es dem Benutzer, die Volumina der Arbeitsreagenzien dem Bedarf anzupassen und den Abfall zu reduzieren.

REAGENZIEN

NAPHTHOL AS-D CHLORAZETAT-LÖSUNG,

Bestell-Nr. 91-1

Naphthol AS-D Chlorazetat, 8 mg/ml, und Stabilisator.

FAST RED VIOLET LB STANDARDLÖSUNG, Bestell-Nr. 91-2
Fast Red Violet LB Standardlösung, 15 mg/ml, in 0,4 mol/l Salzsäure und Stabilisatoren.

TRIZMAL™ 6,3 KONZENTRAT, Bestell-Nr. 91-3

TRIZMA® Maleat, 1 mol/l, mit Surfactant. pH 6,3 ± 0,15 bei 25 °C.

NATRIUMNITRIT-LÖSUNG, Bestell-Nr. 91-4

Natriumnitrit, 0,1 mol/l.

ZITRATLÖSUNG, Bestell-Nr. 91-5

Zitronensäure, 18 mmol/l, Natriumzitat, 9 mmol/l, Natriumchlorid, 12 mmol/l, und Surfactant. pH 3,6 ± 0,1 bei 25 °C.

α -NAPHTHYL-AZETAT-LÖSUNG Bestell-Nr. 91-6

α -Naphthyl-Azetat, 12,5 mg/ml, in Methanollösung mit Stabilisatoren.

FAST BLUE BB STANDARDLÖSUNG, Bestell-Nr. 91-7

Fast Blue BB Standardlösung, 15 mg/ml, in 0,4 mol/l Salzsäure und Stabilisatoren.

TRIZMAL™ 7,6 KONZENTRAT, Bestell-Nr. 91-8

TRIZMA® Maleat, 1 mol/l, mit Surfactant. pH 7,6 ± 0,15 bei 25 °C.

HÄMATOXYLIN-LÖSUNG, GILL NR. 3, Bestell-Nr. GHS-3

Zertifiziertes Hämatoxylin, 6,0 g/l, Natriumiodat, 0,6 g/l, und Aluminiumsulfat, 52,8 g/l, mit Stabilisatoren.

NATRIUMFLUORID-LÖSUNG, Bestell-Nr. 91-9

Natriumfluorid, 20 g/l

AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT:

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

TRIZMAL™ 6,3 Pufferkonzentrat, TRIZMAL™ 7,6 Pufferkonzentrat und die Zitratlösung eignen sich bei

Abwesenheit einer mikrobiellen Besiedlung zur Verwendung. Die übrigen Reagenzien sind bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum stabil.

PRODUKTVERFALL:

Das TRIZMAL™ Konzentrat und die Zitratlösung bei mikrobieller Besiedlung entsorgen. Die Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, entsorgen, falls sie sich braun (durch Luft überoxidiert) oder violett (Säureverlust) verfärbt.

VORBEREITUNG:

Vor Verwendung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18–26 °C) erwärmen. Die Esterase-Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

Zitrat-Azeton-Formaldehyd-Fixiermittel: Zu 25 ml Zitratlösung, Bestell-Nr. 91-5, 65 ml Azeton und 8 ml 37 % Formaldehyd zugeben. In eine Glasflasche füllen und fest verschließen. Im Kühlschrank bei (2–8 °C) aufbewahren. Vor Gebrauch auf Raumtemperatur 18–26 °C erwärmen. Bis zu 4 Wochen stabil, wenn das Reagenz fest verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt wird

VORSICHTSMASSNAHMEN:

Bei der Handhabung von Laborreagenzien sollten normale Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen, staatlichen und nationalen Vorschriften befolgen. Aktuelle Hinweise zu Risiken, Gefahren und Sicherheitsmaßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

US-Gefahren- und Sicherheitsangaben

Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung ist ein REIZMITTEL. Kann explosive Peroxide bilden. Kontakt mit der Haut kann zu einer Sensibilisierung führen. Behälter dicht geschlossen halten. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Fast Red Violet LB Standardlösung ist TOXISCH. Bei Verschlucken schädlich. Bei Einatmen toxisch. Verursacht Verätzungen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Zielorgane: Leber und Nieren.

TRIZMAL™ 6,3 Konzentrat. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

α -Naphthyl-Azetat-Lösung ist ENTZÜNDEND und TOXISCH. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Reizt Augen und Haut. Toxisch: Gefahr schwerer, irreversibler Schäden bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Fast Blue BB Standardlösung ist TOXISCH. Bei Verschlucken schädlich. Bei Einatmen toxisch. Verursacht Verätzungen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Zielorgane: Leber und Nieren.

Gills 3 Hämatoxylin-Lösung ist SCHÄDLICH. Bei Verschlucken schädlich. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Azeton ist ENTZÜNDEND und ein REIZMITTEL. Reizt die Augen. Wiederholte Exposition kann zu trockener oder rissiger Haut führen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Schwindel verursachen. Den Behälter an einem gut durchlüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Zielorgane: Leber und Nieren.

2 % Natriumfluorid-Lösung. Vorsicht: Nicht einatmen und Kontakt vermeiden. Zielorgane: Nieren und Knochen.

Formaldehyd-Lösung ist TOXISCH. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Verursacht Verätzungen. Verdacht auf krebserzeugende Wirkung. Kontakt mit der Haut kann zu einer Sensibilisierung führen. Kann vererbare genetische Schäden verursachen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Nur an gut durchlüfteten Orten verwenden.

EU-Gefahren- und Sicherheitsangaben

Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung ist ein REIZMITTEL. Kann explosive Peroxide bilden. Kontakt mit der Haut kann zu einer Sensibilisierung führen. Behälter dicht geschlossen halten. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Fast Red Violet LB Standardlösung ist SCHÄDLICH. Bei Verschlucken schädlich.

TRIZMAL™ 6,3 Konzentrat. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

α -Naphthyl-Azetat-Lösung ist TOXISCH. Entzündlich. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Toxisch: Gefahr schwerer, irreversibler Schäden bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Reizt Augen und Haut. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Fast Blue BB Standardlösung ist SCHÄDLICH. Bei Verschlucken schädlich.

Gills 3 Hämatoxylin-Lösung ist SCHÄDLICH. Bei Verschlucken schädlich. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Azeton ist HOCHENTZÜNDEND und ein REIZMITTEL. Hochentzündlich. Reizt die Augen. Wiederholte Exposition kann zu trockener oder rissiger Haut führen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Schwindel verursachen. Den Behälter an einem gut durchlüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen.

2 % Natriumfluorid-Lösung. Dämpfe nicht einatmen. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.

Formaldehyd-Lösung ist TOXISCH. Toxisch bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Verursacht Verätzungen. Verdacht auf krebserzeugende Wirkung. Kontakt mit der Haut kann zu einer Sensibilisierung führen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Nur an gut durchlüfteten Orten verwenden.

VERFAHREN

PROBENNAHME:

Es wird empfohlen, die Probenahme gemäß NCCLS-Dokument M29-A2 durchzuführen. Keine Testmethode kann eine absolute Gewähr dafür liefern, dass Blut- und Gewebeproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate und Gewebeproben als potenziell infektiös behandelt werden.

Blut, Knochenmarkfilme, Abklatschpräparate und Zytozentrifugenpräparate können mit α -Naphthylazetat-Esterase wie auch mit Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase verwendet werden. Entweder EDTA oder Heparin dient als Antikoagulant.¹⁰ Gefrorenes oder in Paraffin eingebettetes Gewebe kann mit Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase verwendet werden. α -Naphthylazetat-Esterase wird auf gefrorenen Gewebeschnitten erfolgreich verwendet.¹¹ Blut oder Knochenmarkfilme können bei Raumtemperatur (18–26 °C) fixiert mehrere Wochen und unfixiert mehrere Tage aufbewahrt werden, ohne dass es zu merklichen Veränderungen der Aktivität kommt.^{5,10} Kein Vollblut für Assays an andere Labors versenden. Fixierte oder unfixierte Objektträger verschicken. Während des Transports sollten die Objektträger gekühlt werden. Vor dem Fixieren sollten die Filme mindestens 1 Stunde trocknen.

SPEZIELL ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN:

Azeton, ACS-Reagenz

Formaldehyd, 37 %, ACS

Natriumfluorid-Lösung, Bestell-Nr. 91-9 (erforderlich für das

Verfahren α -Naphthyl-Azetat-Esterase mit Fluoridinhibition).

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS:

Die beschriebenen Verfahren werden bei 37 °C durchgeführt. Wenn die Reagenzien nicht bei dieser Temperatur liegen, wird u.U. eine schwache oder negative Reaktion erzielt. Es wird empfohlen, die Temperaturen mit einem genauen Thermometer zu überprüfen. Wasserbäder mit kontrollierter Temperatur eignen sich besser als Inkubatoren mit warmer Luft und sollten für zytochemische Enzym-Methoden verwendet werden. Da Glas Hitze besser leitet als Kunststoff, sollten Coplin-Küvetten aus Glas verwendet werden.

Viele Enzymsysteme reagieren auf kleinste Spuren von Reinigungsmitteln. Glasgeschirr mit verdünnter Bleiche waschen und mit großen Mengen entionisiertem Wasser spülen, um den Auswirkungen von Reinigungsmitteln auf die Zellenzyme vorzubeugen.

Das unter Abschnitt "Reagenzien" beschriebene Fixiersystem enthält Formaldehyd. Wird das Fixiermittel nicht durch gründliches Spülen vollständig entfernt, können Aldehyddruckstände, entweder konzentriert auf luftgetrockneten Objektträgern oder in Spuren von nassen Objektträgern, die dem Inkubationssystem hinzugefügt werden, zu einer Enzyminhibierung führen. Um den Verlust des Blutfilms während

des Spülens zu verhindern, den Wasserstrahl oberhalb des Federrands auf den Objektträger leiten. Beide Seiten des Objektträgers spülen.

Die Ergebnisse beruhen bis zu einem bestimmten Grad auf subjektiver Auswertung. Die einzelnen Labors sollten ihre eigenen Normbereiche festlegen.

Die aus diesem Verfahren gewonnenen Daten dienen nur als Hilfe zur Diagnose und sollten im Zusammenhang mit anderen klinischen Diagnostiktests und Informationen überprüft werden.

HINWEISE:

Benutzer der Sigma Kits 390-A und 91-C sollten mit den TRIZMA® Pufferkonzentraten, Bestell-Nr. 91-3 und 90-3C, sorgfältig umgehen, da diese nicht untereinander austauschbar sind. Die Verwendung eines falschen Puffers führt zu einer negativen Reaktion.

VERFAHREN:

Die beschriebenen Verfahren werden bei 37 °C durchgeführt

NAPHTHOL AS-D CHLORAZETAT-ESTERASE-VERFAHREN:

1. Eine ausreichende Menge entionisiertes Wasser zur Verwendung als Substrat auf 37 °C vorwärmen. Vor der Verwendung Temperatur überprüfen.
2. Unmittelbar vor der Fixierung 1 ml Natriumnitrit-Lösung zu 1 ml Fast Red Violet LB Standardlösung zugeben, die sich in einem Teströhrchen befindet. Durch Umdrehen sorgfältig mischen und 2 Minuten stehen lassen. Aktive Entwicklung von Gasblasen vermeiden.
3. Die Lösung aus Schritt 2 zu 40 ml vorgewärmtem entionisiertem Wasser hinzufügen.
4. 5 ml TRIZMAL™ 6,3 Pufferkonzentrat hinzufügen. (Siehe "Hinweis")
5. 1 ml Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung zugeben. Die Lösung sollte rot werden. Gut mischen und in eine Coplin-Küvette gießen.
6. Die Zitrat-Azeton-Formaldehyd (CAF)-Lösung auf Raumtemperatur (23–26 °C) bringen. Die Objektträger durch Eintauchen in CAF-Lösung 30 Sekunden fixieren.
7. Die Objektträger unter fließendem Leitungswasser 45–60 Sekunden gründlich spülen, dann in die Lösung aus Schritt 5 geben. Die Objektträger dürfen nicht trocknen.
8. Bei 37 °C 15 Minuten vor Licht geschützt inkubieren.
9. Die Objektträger nach 15 Minuten entfernen und gründlich 2 Minuten in entionisiertem Wasser spülen.
10. 2 Minuten in Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, gegenfärben.
11. Unter Leitungswasser spülen und an der Luft trocknen lassen.
12. Unter dem Mikroskop untersuchen. Falls die Objektträger mit einem Deckglas versehen werden müssen, nur ein wässriges Fixiermittel verwenden.

HINWEISE:

1. Bei Verwendung von Columbia-Küvetten die Reagenzvolamina durch 5 teilen.
2. Falls das Substrat (siehe Schritt 5) getrübt ist, auf Raumtemperatur (23–26 °C) bringen und gut mischen.
3. Falls die Objektträger vorfixiert und aufbewahrt wurden, die Fixierung (Schritte 6 und 7) überspringen und mit dem Färben der trockenen Objektträger ab Schritt 8 beginnen.

α-NAPHTHYLAZETAT-ESTERASE-VERFAHREN:

1. Eine ausreichende Menge entionisiertes Wasser zur Verwendung als Substrat auf 37 °C vorwärmen. Vor der Verwendung Temperatur überprüfen.
2. Unmittelbar vor der Fixierung 1 ml Natriumnitrit-Lösung zu 1 ml Fast Blue BB Standardlösung zugeben, die sich in einem Teströhrchen befindet. Durch Umdrehen mischen und mindestens 2 Minuten stehen lassen. Die Farbe wird sich von schmutziggelblich zu hellgelb verändern. Aktive Entwicklung von Gasblasen vermeiden.
3. Die Lösung aus Schritt 2 zu 40 ml vorgewärmtem entionisiertem Wasser hinzufügen.
4. 5 ml TRIZMAL™ 7,6 Pufferkonzentrat hinzufügen.
5. 1 ml α-Naphthyl-Azetat-Lösung hinzufügen. Die Lösung sollte grünlich werden. Gut mischen und in eine Coplin-Küvette gießen.
6. Die Zitrat-Azeton-Formaldehyd (CAF)-Lösung auf Raumtemperatur (23–26 °C) bringen. Die Objektträger durch Eintauchen in CAF-Lösung 30 Sekunden fixieren. Die Objektträger während der letzten 5 Sekunden heftig bewegen.
7. Die Objektträger unter fließendem entionisiertem Wasser 45–60 Sekunden gründlich spülen, dann in die Lösung aus Schritt 5 geben. Die Objektträger dürfen nicht trocknen.
8. Bei 37 °C 30 Minuten vor Licht geschützt inkubieren.
9. Die Objektträger nach 30 Minuten entfernen und gründlich 2 Minuten in entionisiertem Wasser spülen.

10. 2 Minuten in Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, gegenfärben.
11. Unter Leitungswasser spülen und an der Luft trocknen lassen.
12. Unter dem Mikroskop untersuchen. Falls die Objektträger mit einem Deckglas versehen werden müssen, nur ein wässriges Fixiermittel verwenden.

HINWEISE:

1. Bei Verwendung von Columbia-Küvetten die Reagenzvolamina durch 5 teilen.
2. Falls das Substrat (siehe Schritt 5) getrübt ist, auf Raumtemperatur (23–26 °C) bringen und gut mischen.
3. Falls die Objektträger vorfixiert und aufbewahrt wurden, die Fixierung (Schritte 6 und 7) überspringen und mit dem Färben der trockenen Objektträger ab Schritt 8 beginnen.

DOPPELFÄRBUNGS-ESTERASE-VERFAHREN:

1. Einen α-Naphthylazetat-Esterase-Test wie in Verfahren beschrieben durchführen. Nicht gegenfärben.
2. Die Objektträger 5 Minuten in entionisiertem Wasser spülen.
3. Den Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Test durchführen, wie er in den Schritten 1–12 beschrieben ist. Schritt 6 auslassen.

VERFAHREN α-NAPHTHYLAZETAT-ESTERASE MIT FLUORID-INHIBITION:

Obwohl α-Naphthylazetat-Esterase vorwiegend in Zellen monozytischer Linien gefunden wird, wenn das Verfahren wie beschrieben durchgeführt wird, sollte festgehalten werden, dass Megakaryozyten und Erythroid-Vorläufer für dieses Enzym positiv sind.¹² Lymphozyten und einige andere reife Granulozyten sind gelegentlich ebenfalls positiv.⁵ Um diese Zellen vollständig von Monozyten zu unterscheiden, wird Natriumfluorid in das Inkubationssystem integriert. In Gegenwart dieser Verbindung wird das Monozytenenzym inaktiviert.¹³ Das folgende Verfahren kann angewendet werden, um den Fluorid-Inhibitions-Test durchzuführen.

1. Zu 2 ml Fast Blue BB Standardlösung 2 ml Natriumnitrit-Lösung hinzufügen. Durch Umdrehen sorgfältig mischen. 2 Minuten stehen lassen.
2. 2 Becher mit A und B kennzeichnen und Folgendes hinzugeben:

	Becher A	Becher B
Auf 37 °C vorgewärmtes entionisiertes Wasser	40 ml	40 ml
Diazotiertes Fast Blue BB aus Schritt 1	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7,6 Konzentrat	5 ml	5 ml
α-Naphthylazetat-Lösung	1 ml	1 ml
Natriumfluorid-Lösung	—	1 ml

3. Gut mischen und in die mit A und B gekennzeichneten Coplin-Küvetten geben.
4. Wie in den Schritten 6–12 des α-Naphthylazetat-Esterase-Verfahrens beschrieben weiterfahren.

LEISTUNGSMERKMALE

BEWERTUNGSMETHODE:

Den Film scannen und eine dünne Schicht mit wenigen Erythrozyten wählen. Stellen mit Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Aktivität erscheinen als hellrote Granulierung, α-Naphthylazetat-Esterase als schwarze Granulierung. Von 0 bis 4+ entsprechend der Quantität und Intensität der einzelnen Farbstoffe innerhalb des Zytoplasmas der entsprechenden Zelltypen bewerten. Die Merkmale der Bewertung beruhen teilweise auf einer subjektiven Auswertung. Tabelle 1 zeigt ein mögliches Bewertungsformat. Ergebnisse beruhen auf der relativen Gegenwart oder Abwesenheit der Färbung.

TABELLE I Bewertungsmerkmale		
Zelle Bewertung	Intensität der Färbung	Auswertung
0	Keine	–
1+	Schwach bis mäßig	±
2+	Mäßig bis Stark	+
3+	Stark	++
4+	Sehr stark	+++

ERWARTETE ERGEBNISSE:

NAPHTHOL AS-D CHLORAZETAT-ESTERASE:

(Fast Red Violet LB) – Dieses Enzym wird als spezifisch für Zellen einer granulozytären Zelllinie betrachtet. Aktive Stellen weisen eine hellrote Granulierung auf. In Monozyten und Lymphozyten ist die Aktivität nur schwach oder nicht vorhanden.

α-NAPHTHYLAZETAT-ESTERASE:

(Fast Blue BB) – Das Enzym wird vorwiegend in Monozyten, Makrophagen und Histiocyten nachgewiesen und tritt in Granulozyten kaum auf. Monozyten sollten eine schwarze Granulierung aufweisen. Lymphozyten können gelegentlich eine Enzymaktivität aufweisen.

α-NAPHTHYLAZETAT-ESTERASE MIT FLUORID-INHIBITION:

Alle Zellen monozytärer Zelllinien weisen keine Enzymaktivität auf, außer den differenzierten Histiocyten oder spezialisierten Makrophagen in Geweben, die auch gegenüber Natriumfluorid resistent sein können.¹¹

DOPPELFÄRBUNGS-ESTERASE:

Proben, die das Doppelfärbungsverfahren durchlaufen haben, werden Granulozyten mit roter Granulierung und Monozyten mit schwarzer Granulierung zeigen.

HINWEIS: Die Fast Blue BB Standardlösung, Bestell-Nr. 91-7, kann durch Fast Red Violet LB Standardlösung, Bestell-Nr. 91-2, ersetzt werden, falls für die Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase eine blaue Granulierung erwünscht ist.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Das Reagenzsystem sollte anhand positiver und negativer Kontrollobjektträger überwacht werden.

Positive Kontrollobjektträger sollten aus leukämischen Proben oder spezifischen Zelllinien zubereitet werden, die bekannt positiv sind. Zelllinien sind von der American Type Culture Collection (ATCC) in Kulturen, gefroren und in flüssigem Stickstoff konserviert erhältlich. Für Positivkontrollen eignen sich: A-937, aus einem menschlichen histiozytischen Lymphom, für eine unspezifische Esterase; HL-60, eine promyelozytische Linie, für die Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase; und Molt-4, aus einer T-Zell-Leukämie, für α-Naphthylazetat-Esterase. Zur ordnungsgemäßen Handhabung und Verfahrensweise die den Zelllinien beiliegende Literatur lesen.

Als Alternative kann auch antikoaguliertes Blut aus normalen Proben (beim α-Naphthylazetat-Esterase-Verfahren vorzugsweise Proben mit erhöhter Anzahl Monozyten) verwendet werden; diese Proben werden jedoch eine weniger intensive Färbung und weniger positive Zellen aufweisen.

Bekannt negative Patientenobjektträger können als Negativkontrolle verwendet werden. Falls keine vorhanden sind, kann eine Probe im Inkubationsgemisch ohne Substrat gefärbt werden, was zum erwünschten Ergebnis führt. Es wird jedoch die Verwendung einer Negativkontrolle empfohlen.

Falls sich die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen unterscheiden, bitte den technischen Kundendienst von Sigma-Aldrich verständigen.

LITERATURANGABEN

1. Beard MEJ, Fairly GH: Acute leukemia in adults. *Semin Hematol* 11:5, 1974
2. Beckmann J, Neth R, Gaedicke G, et al: Cytology and cytochemistry of the leukemic cell. *Haematol Bluttransfus* 14:26, 1974
3. Bennet JM, Reed CE: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. *Blood Cells* 1:101, 1975
4. Cawley JC, Hayhoe FGJ: Acute leukemia: Cellular morphology, cytochemistry and fine structure. *Clinics in Haematol* 1:49, 1972
5. Yam LT, Li CY, Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 55:283, 1971
6. Yam LT, Li CY, Wolfe NJ, Moy PW: Histochemical study of acute leukemia. *Arch Pathol* 97: 129, 1974
7. Burstone MS: The cytochemical localization of esterase. *J Natl Cancer Inst* 18:167, 1957
8. Moloney WC, McPherson K, Flegerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem* 8:200, 1960
9. Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
10. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Leas and Febriger, Philadelphia, 1984, pp 127–130
11. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 24, 38
12. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 34, 111
13. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterase in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 21:1, 1973
14. The Leukemias. A Cytochemical Comparison and Differentiation. Sigma Diagnostics, 1989

TRIZMA ist ein eingetragenes Warenzeichen und TRIZMAL ein Warenzeichen von Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO

Sigma-Aldrich, Inc. gewährleistet, dass ihre Produkte mit den Angaben in dieser und anderen Sigma-Aldrich-Publikationen übereinstimmen. Der Anwender entscheidet selbst über die Eignung des Produkts für den jeweiligen Einsatzzweck. Es können zusätzliche Geschäftsbedingungen gelten. Weitere Informationen zu den Verkaufsbedingungen finden Sie auf der Rückseite der Rechnung oder des Lieferscheins.

Verfahren Nr. 91
Vorherige Ausgabe: 2003-02
Revidiert: 2003-09



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

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765
Technischer Kundendienst: R-Gespräch +1 314 771 3122
oder Email an clintech@sial.com
Bestellungen: R-Gespräch +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Postfach 1120, 89552 Steinheim, Deutschland 49-7329-970