

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Για ιστοχημικό εντοπισμό της ενδοκυτταροπλασματικής αναγωγής NBT στα ουδετερόφιλα για αναγνώριση της δυσλειτουργίας των ουδετερόφιλων ή/και την διάρκεια της πυρετογόνου λοίμωξης.² Τα αντιδραστήρια της χρωστικής NBT προορίζονται για "In Vitro Διαγνωστική Χρήση."

Ο Park και οι συνεργάτες του¹ ήταν οι πρώτοι που εφάρμοσαν την εξέταση αναγωγής μπλε νίτρο τετραζολίου (NBT) στα ουδετερόφιλα ως διαγνωστικό βοήθημα για την διαφοροποίηση των πυρετωδών καταστάσεων που οφείλονται σε βακτηρίδια και εκείνων που δεν οφείλονται σε αυτά. Η εξέταση περιλάμβανε επώαση του αίματος με ρυθμιστικό διάλυμα NBT. Παρασκευάζονται επιχρίσματα, χρωματίζονται και εξετάζονται με μικροσκόπιο για τον καθορισμό του ποσοστού των ουδετερόφιλων που εμφανίζουν ενδοκυτταρικές αποθέσεις φορμαζάνης. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται συνήθως σε περίπτωση βακτηριδιακών μολύνσεων.

Ορισμένες ασθένειες, και ειδικά εκείνες που περιλαμβάνουν μεταβολικές ανωμαλίες στη λειτουργία των ουδετερόφιλων, εμφανίζουν χαμηλές ή φυσιολογικές τιμές εξέτασης NBT, ακόμα και όταν υπάρχει ενεργή βακτηριδιακή λοίμωξη. Οι καταστάσεις αυτές μπορούν να εντοπιστούν με τροποποίηση της εξέτασης NBT ώστε να συμπεριληφθεί και η *in vitro* διέγερση του φαγοκυτταρικού συστήματος. Η διέγερση αυτή μπορεί να επιτευχθεί ενσωματώνοντας διήθημα από καλλιέργεια βακτηρίων,^{2,3} σωματίδια από φυσικό ελαστικό,^{4,5} ζυμοσάνη,⁶ ενδοτοξίνη,^{7,9} επαφή υάλου,⁸ ή υψηλές συγκεντρώσεις ηπαρίνης,⁹⁻¹² στο μίγμα αίματος-NBT που επωάζεται. Η διέγερση *in vitro* αίματος φυσιολογικών ατόμων, χωρίς κυτταρικές ή χημικές ανωμαλίες και χωρίς βλάβες του μεταβολισμού των κοκκιοκυττάρων, εμφανίζει σημαντική αύξηση του ποσοστού ουδετερόφιλων που περιέχουν φορμαζάνη. Τα κύτταρα των ασθενών που παρουσιάζουν τέτοιες ανωμαλίες (π.χ., χρόνια κοκκιομάτωση, CGD) δεν εμφανίζουν θετική αντίδραση, ακόμα κι όταν διεγείρονται.^{4,6,8,11}

Αρκετές εκθέσεις έχουν παρουσιαστεί^{2,4,7,13-27} που είτε επιβεβαιώνουν, είτε διαφωνούν με τους αρχικούς ισχυρισμούς¹ σχετικά με τη διαγνωστική χρησιμότητα της εξέτασης αυτής. Σε μία ανασκόπηση της ισχύουσας κατάστασης για την εξέταση NBT σε κλινικές διαγνώσεις, ο Segal²⁸ δηλώνει ότι η εξέταση αυτή έχει μικρή χρησιμότητα για τη διάγνωση της πυρετογόνου λοίμωξης. Απαντώντας στην κριτική αυτή, οι Freeman και King²⁹ τονίζουν ότι ενδέχεται να προκύψουν αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα που προέρχονται από διαφορετικά εργαστήρια λόγω της χρήσης ελλιπώς τυποποιημένων τροποποιήσεων της αρχικής διαδικασίας του Park.¹

Οι τεχνικοί παράγοντες που έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν τα αποτελέσματα της εξέτασης NBT, είναι:

1. Η διάρκεια και η θερμοκρασία αποθήκευσης του αίματος πριν από την ανάλυση.^{9,10}
2. Η διάρκεια και η θερμοκρασία επώασης του μείγματος αίματος-NBT.^{6,9,12,30-34}
3. Η συγκέντρωση ηπαρίνης ή NBT.^{6,9,12,31-34}
4. Τριχοειδικό αίμα αντί φλεβικού αίματος.³⁵
5. Επαφή με πλαστικό αντί για σιλκωμένη ύαλο κατά την επώαση.³⁴
6. Η εμπειρία του παρατηρητή.^{15,29}
7. Επαφή με σιλκωμένη αντί μη σιλκωμένη ύαλο κατά την αποθήκευση ή την επώαση.⁶
8. Συλλογή σε σωληνάρια Vacutainer[®].²⁴
9. Κριτήρια για χαρακτηρισμό των κυττάρων ως θετικά ή αρνητικά.^{2,11,26,33,35}
10. Χρήση EDTA ως αντιπηκτικού. Προκύπτει αναστολή της απόκρισης NBT.^{3,12}

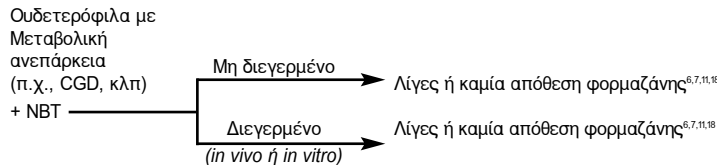
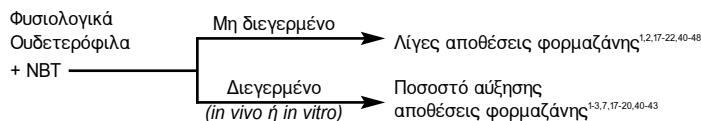
Η ανασταλτική επίδραση του EDTA καταργείται προφανώς αν η εξέταση εκτελεστεί σε φλεγμονώδη πλάκοντα που παρασκευάζεται από συνολικό αίμα παρουσία Ficoll[®], ενός πολυμερούς της σακχαρόζης.³³ Το Ficoll[®] αναφέρεται ότι επιδρά προστατευτικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια της επώασης τους με NBT.³⁶ Η χρήση φλεγμονώδους πλάκοντα για τη συγκέντρωση ουδετερόφιλων, και επομένως επίπτωση του χρόνου απαρίθμησης, έχει προταθεί επίσης από τον Patterson³⁷ και άλλους.^{20,38}

Λόγω της ανάγκης για τυποποίηση, η Sigma-Aldrich παρέχει μια ημι-ποσοτική διαδικασία NBT, που βασίζεται στην τροποποίηση της μεθόδου των Feigin et al.^{17,34} όπως προκύπτει από τη μέθοδο αναφοράς του Park και των συνεργατών του.¹

Η εξέταση NBT έχει προταθεί ως βοήθημα για:

1. την αναγνώριση ασθενών με χρόνια κοκκιομάτωση ή παρόμοιες ασθένειες εξαιτίας μεταβολικών ανωμαλιών στη λειτουργία των ουδετερόφιλων.^{4,6,11,39}
2. την διάκριση των πυρετωδών καταστάσεων ή/και της λευκοκυττάρωσης που οφείλεται σε βακτηριδιακή λοίμωξη από εκείνες που οφείλονται σε άλλες αιτίες.^{1,7,17,18}
3. τον καθορισμό της απόκρισης σε θεραπεία με αντιβιοτικά.^{1,2,7,17-19}
4. την παρακολούθηση ασθενών με υψηλή ευπάθεια σε βακτηριδιακές μολύνσεις.^{7,20}

Για την εκτέλεση της εξέτασης, δείγματα ηπαρινωμένου αίματος επωάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα NBT υπό ελεγχόμενες συνθήκες.^{1,13,34} Στην συνέχεια παρασκευάζονται επιχρίσματα, χρωματίζονται και εξετάζονται με μικροσκόπιο προκειμένου να καθορισθεί το ποσοστό ουδετερόφιλων που εμφανίζουν ενδοκυτταρο-πλασματικές αποθέσεις NBT που έχει αναχθεί (φορμαζάνη).



Η απόδοση "διεγερμένης" διαδικασίας μπορεί να αποβεί χρήσιμη για την αποκάλυψη της παρουσίας ενδογενούς ανωμαλίας των ουδετερόφιλων.^{4,6,7,11,18,42,49,50}

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

ΦΙΑΛΙΔΙΟ NBT, Αρ. Καταλόγου 840-10

Μπλε νίτρο τετραζόλιο 1 mg, λυοφιλιωμένο, με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού και χλωριούχο νάτριο.

ΗΠΑΡΙΝΗ(N), ΑΛΑΣ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ, Αρ. Καταλόγου 840-20

Σιλκωμένα υάλινα φιαλίδια που περιέχουν ηπαρίνη(N) (χοίρου) 20 μονάδες, για τη συλλογή 1-ml συνολικού αίματος.

ΦΙΑΛΙΔΙΑ, ΥΑΛΙΝΑ ΜΕ ΠΩΜΑΤΑ, Αρ. Καταλόγου 840-50

Σιλκωμένα φιαλίδια για την επώαση των δειγμάτων.

ΧΡΩΣΗ ACCUSTAIN® WRIGHT, Αρ. Καταλόγου WS 10

Χρωστική Wright 0,3 %, ρυθμισμένη σε pH 6,8 σε μεθανόλη.

ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟ, Αρ. Καταλόγου 840-15

Βακτηριδιακά εκχυλίσματα (μη βιώσιμα), λυοφιλιωμένα.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ:

Αποθηκεύστε το φιαλίδιο NBT στο σκοτάδι, στο ψυγείο (2–8 °C). Αποθηκεύστε το Διεγερτικό στο ψυγείο (2–8 °C). Αποθηκεύστε την ηπαρίνη και τα φιαλίδια σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C).

Αποθηκεύστε τη Χρωστική ACCUSTAIN Wright σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

ΠΡΟΤΕΙΜΑΣΙΑ:

Το ΔΙΑΛΥΜΑ NBT παρασκευάζεται με ανασύσταση του Φιαλιδίου NBT, Αρ. Καταλόγου 840-10, με 1,0 mL αποσταγμένο νερό. Αφήστε το να σταθεί λίγα λεπτά και αναμίξτε έντονα. Το φιαλίδιο που έχει ανασυσταθεί παραμένει σταθερό επί 1 ημέρα αν αποθηκευθεί στο ψυγείο (2–8 °C).

Το ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟΥ παρασκευάζεται με ανασύσταση του Διεγερτικού, Αρ. Καταλόγου 840-15, με 1,5 mL αποσταγμένο νερό. Ανακινήστε για να διαλυθεί το περιεχόμενο. Αποθηκεύστε σε θερμοκρασία κάτω των 0 °C. Το διάλυμα μπορεί να καταψυχθεί και να αποψυχθεί αρκετές φορές.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

Πρέπει να ακολουθούνται οι συνθησμένες προφυλάξεις που εφαρμόζονται κατά το χειρισμό αντιδραστηρίων στο εργαστήριο. Απορρίψτε τα απόβλητα λαμβάνοντας υπόψη όλους τους τοπικούς, κρατικούς, επαρχιακούς ή εθνικούς κανονισμούς. Ανατρέξτε στο Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού για οποιοσδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνου, ατυχήματος ή ασφάλειας.

Κίνδυνοι και Δηλώσεις Ασφαλείας στις Η.Π.Α

Φιαλίδια NBT. Προσοχή: Αποφύγετε επαφή και εισπνοή.

Φιαλίδια Ηπαρίνης. Προσοχή: Αποφύγετε επαφή και εισπνοή. Όργανα στόχοι: Αίμα.

Διεγερτικό. Προσοχή: Η ουσία δεν έχει δοκιμαστεί ακόμα πλήρως.

Το Διάλυμα Χρωστικής Wright είναι ΕΥΦΛΕΚΤΟ και ΤΟΞΙΚΟ. Τοξικό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και αν το καταπιείτε. Ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα. Διατηρήστε το μακριά από πηγές ανάφλεξης – μην καπνίζετε. Διατηρείτε το δοχείο καλά κλεισμένο. Να φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό και γάντια. Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν δεν αισθάνεστε καλά, ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή (δείξτε την ετικέτα όπου είναι δυνατό).

Κίνδυνοι και Δηλώσεις Ασφαλείας στην ΕΕ (Προσοχή: Οι ουσίες αυτές δεν έχουν δοκιμαστεί ακόμα πλήρως).

Φιαλίδια NBT. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Μην εισπνέετε τη σκόνη.

Διεγερτικό. Προσοχή: Η ουσία δεν έχει δοκιμαστεί ακόμα πλήρως

Το Διάλυμα Χρωστικής Wright είναι ΠΟΛΥ ΕΥΦΛΕΚΤΟ και ΤΟΞΙΚΟ. Πολύ εύφλεκτο. Τοξικό: Κίνδυνος πολύ σοβαρών μη αντιστρέψιμων επιπτώσεων μέσω εισπνοής, επαφής με το δέρμα και αν το καταπιείτε. Τοξικό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και αν το καταπιείτε. Διατηρήστε το μακριά από πηγές ανάφλεξης – μην καπνίζετε. Διατηρείτε το δοχείο καλά κλεισμένο. Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν δεν αισθάνεστε καλά, ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή (δείξτε την ετικέτα όπου είναι δυνατό). Να φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό και γάντια.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ:

Συνιστάται η συλλογή δειγμάτων να διεξάγεται σύμφωνα με το έγγραφο M29-A2 του NCCLS. Καμία γνωστή μέθοδος εξέτασης δεν μπορεί να προσφέρει απόλυτη διαβεβαίωση ότι τα δείγματα αίματος ή ιστού δεν μεταδίδουν λοιμώξεις. Επομένως, όλα τα παράγωγα αίματος ή δείγματα ιστών πρέπει να θεωρούνται ενδεχομένως λοιμώδη.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Οι τιμές της εξέτασης εκφράζονται σε ποσοστά θετικών ουδετερόφιλων (που περιέχουν φορμαζάνη).

Εξέταση με Μικροσκόπιο και Καταμέτρηση:

Εξέταστε το χρωματισμένο επίχρισμα χρησιμοποιώντας ελαιοκαταδυτικό αντικειμενικό φακό και καταμετρήστε συνολικά 100 ή περισσότερα ουδετερόφιλα. Αναφέρετε ως θετικά τα ουδετερόφιλα εκείνα που εμφανίζουν αποθέσεις φορμαζάνης. Τα κύτταρα ενδέχεται να εμφανίζουν κάποιες φορές διάχυτους κόκκους, αλλά συνήθως εμφανίζονται ως μεγάλα ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα ακανόνιστου σχήματος και χρώματος σκούρου πορφυρού έως μαύρου. Κατά την καταμέτρηση των ουδετερόφιλων ως θετικών, συνιστάται να ακολουθείτε τους όρους που έχουν τεθεί από τον Feigin³⁴. Αυτοί περιλαμβάνουν τα εξής:

1. Το ουδετερόφιλο πρέπει να είναι ολόκληρο, με την κυτταρική του μεμβράνη άθικτη.
2. Το ουδετερόφιλο πρέπει να είναι μεμονωμένο, χωρίς να έρχεται σε επαφή μαζί του άλλο κύτταρο ή κυτταρικό υλικό (εκτός από ερυθρά αιμοσφαίρια). Τα ουδετερόφιλα που περιέχονται σε θρόμβους λευκοκυττάρων ή αιμοπεταλίων δεν πρέπει να υπολογίζονται.
3. Για να θεωρηθούν θετικά, τα ουδετερόφιλα πρέπει να περιέχουν αποθέσεις φορμαζάνης ως μεγάλες, ευδιάκριτες μάζες ακανόνιστου σχήματος.
4. Στη συνέχεια καταγράφεται το ποσοστό των 100 ή περισσότερων θετικών ουδετερόφιλων που καταμετρήθηκαν.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Μόνο τα ουδετερόφιλα καταμετρώνται. Αποθέσεις φορμαζάνης μπορεί επίσης να παρουσιαστούν σε μονοκύτταρα ή σε θρόμβους αιμοπεταλίων.^{13,51,52} Για περισσότερη εξειδίκευση, ο καθορισμός του ποσοστού των θετικών NBT ουδετερόφιλων μπορεί να γίνει παράλληλα με μία συνολική καταμέτρηση και διαφοροποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων προκειμένου να επιτραπεί ο υπολογισμός του απόλυτου αριθμού των θετικών κυττάρων. Ο Feigin και οι συνεργάτες του³⁷ χρησιμοποίησαν το ποσοστό των θετικών για NBT και τον απόλυτο αριθμό των θετικών για NBT ουδετερόφιλων για την δημιουργία ενός νομογράμματος για την ταξινόμηση των διφορούμενων ασθενών. Παρόλα αυτά, η χρήση του δημοσιευμένου νομογράμματος τους δεν συνιστάται εκτός κι αν η ακρίβεια της εφαρμογής του μπορεί να καταδειχθεί από το εργαστήριό σας.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Φυσιολογικό Εύρος ¹⁷	2–17 %	Θετικά Κύτταρα
Μέσος όρος	9 %	Θετικά Κύτταρα

Οι περισσότεροι ερευνητές^{1-3,14,18,20-22,40-48,53-55} αναφέρουν ότι η μέση τιμή για θετικά ουδετερόφιλα (που περιέχουν φορμαζάνη) σε κλινικά υγιή άτομα δεν υπερβαίνει το 10%, αν και σε ορισμένα δείγματα παρατηρούνται τιμές έως και 17 %¹⁷. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν^{12,17,21,40-42} ότι το ποσοστό των θετικών ουδετερόφιλων αυξάνεται συνήθως όταν υπάρχει βακτηριδιακή λοίμωξη, με την προϋπόθεση ότι τα λευκοκύτταρα είναι μεταβολικά κατά φύση. Οι Paterson και Matula² βρήκαν ότι όλοι οι ασθενείς με βακτηριαιμία παρουσιάζουν αυξημένες τιμές στην εξέταση NBT.

Φυσιολογικές ή χαμηλές τιμές απουσία βακτηριδιακής λοίμωξης αναφέρονται σε:

λώσεις^{12,7,17}
Ρευματοειδή αρθρίτιδα^{15,53}
Πνευμονικό εμβολισμό¹⁵
Ασθενείς με εμφύτευση ιστού^{2,7}
Καρκίνο^{2,18}
Γυναίκες μετά τον τοκετό^{7,47}
Μετεγχειρητικούς ασθενείς⁷
Άλλες πυρετώδεις καταστάσεις (ή όσες εμφανίζουν λευκοκυττάρωση) μη βακτηριδιακής προέλευσης^{1,2,7,15,18}

Φυσιολογικές ή χαμηλότερες τιμές παρουσία βακτηριδιακής λοίμωξης αναφέρονται σε:

Τοπικές μολύνσεις^{7,13,53,56} (In vitro μελέτες δείχνουν ότι η απόκριση των ουδετερόφιλων απαιτεί διέγερση αρκετά μεγάλης ισχύος)
Χορήγηση κορτικοστεροειδών, φαιυλοβουταζόνης και ανοσο-κατασταλτικών παραγόντων^{43,47,49,54}
Θεραπεία με αντιβιοτικά όπου η αποτελεσματικότητα μπορεί να καταδειχθεί με μείωση του ποσοστού των θετικών, κάποιες φορές σε χρόνο μικρότερο των 6 ωρών¹⁸
Πρωτογενή φυματίωση^{7,13}
Μεταβολικές ανωμαλίες της λειτουργίας των ουδετερόφιλων, όπως:
Χρόνια κοκκιωματώση^{7,17,51,42,49}
Ουδετερόφιλες ανεπάρκειες της μυελοϋπεροξειδάσης⁵⁷ ή της αφυδρο-γονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης⁵⁰
Συγγενή και επίκτητη αγαμμασφαιραιμία⁷
Συστημικό ερυθριματώδη λύκο^{2,5,18}
Παθήσεις που χαρακτηρίζονται από ανοσοσυμπλέγματα¹⁵
Ιστοκυττάρωση λιποχρώματος⁷
Χρόνια μυελώδη λευχαιμία^{43,44}
Σύνδρομο Kwashiorkor⁵⁹
Διαβήτη⁵⁸
Γενικευμένες μολύνσεις^{22,27,54,57}

Αυξημένες τιμές αναφέρονται σε:

Βακτηριδιακές λοιμώξεις^{1-3,7,13,17,21,33,40-42,53,55,57,58}
Λοιμώξεις Nocardia ή άλλες συστηματικές μυκητιάσεις^{12,57}
Διάφορες παρασιτικές μολύνσεις, συμπεριλαμβανομένης της ελονοσίας^{2,40,41,48}
Κεγχροειδή φυματίωση¹³
Φυματική μηνιγγίτιδα^{7,13}

Το αίμα δεν πρέπει να συλλέγεται σε διάστημα μεγαλύτερο των δύο ωρών πριν από την εκτέλεση της εξέτασης. Αν δεν υποβληθεί αμέσως σε εξέταση, το δείγμα πρέπει να αποθηκευθεί στο ψυγείο.^{9,33} Μια πλαστική σύριγγα χρησιμοποιείται για την φλεβοπαράκντηση. Η εισαγωγή υγρών ιστού πρέπει να αποφεύγεται. Η βελόνα αφαιρείται από τη σύριγγα πριν από την προσεκτική εξώθηση ακριβώς 1 mL αίματος σε σιλκονοζήλο φιαλίδιο συλλογής που περιέχει 20 μονάδες Ηπαρίνης, Αρ. Καταλόγου 840-20. Αναμίξτε ήπια, αλλά καλά, γέροντας ελαφρά και "κυλώντας" το φιαλίδιο για περίπου 30 δευτερόλεπτα. Αποφύγετε την επαφή του αίματος με το πώμα.

ΕΙΔΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ:

Μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό αντικειμενικό φακό

Συσκευές μεταφοράς με πιπέτα για την ακριβή χορήγηση των όγκων που απαιτούνται για την ανάλυση

Υδατόλουτρο, 37 °C

Αντικειμενοφόροι μικροσκοπίου

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

Όταν η διαδικασία εκτελείται χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο με φυσιολογικό δείγμα αίματος, πρέπει να λάβετε έντονη απόκριση. Αν αυτό δεν συμβεί, το αντιδραστήριο ενδέχεται να έχει αποσυντεθεί.

Παχύ επίχρισμα παρέχει μεγαλύτερο αριθμό ουδετερόφιλων, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό όταν οι σχετικοί και οι απόλυτοι αριθμοί των ουδετερόφιλων είναι χαμηλοί, επιτρέποντας έτσι την ταχύτερη απαρίθμηση.

Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίζει τον δικό του βέλτιστο χρόνο χρώσης.

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να προσδιορίζει το φυσιολογικό εύρος. Το αίμα των φυσιολογικών ατόμων πρέπει να υποβάλλεται και στις δύο περιγραφόμενες διαδικασίες ελέγχου με κάθε σειρά εξετάσεων. Αν το σύστημα αντιδραστηρίων λειτουργεί ικανοποιητικά, ο αριθμός των κυττάρων που περιέχουν φορμαζάνη αυξάνεται πέραν του φυσιολογικού μετά την διέγερση του μάρτυρα με το βακτηριδιακό εκχύλισμα.

Η ποσοτική απόκριση των κλινικά υγιών ατόμων που λαμβάνεται με την εξέταση διεγερμένου NBT ποικίλει σημαντικά²³ και δυσχεραίνει την ερμηνεία. Παρόλα αυτά, οι τιμές της εξέτασης NBT αυξάνονται συνήθως σε επιπλέον ποσοστό 10–50 % των θετικών κυττάρων εξαιτίας της παρουσίας διαφόρων διεγερτικών.^{2,33,24} Για παράδειγμα, ένα μη διεγερμένο δείγμα που απέδωσε 10 % θετικά κύτταρα αναμένεται ενδεχομένως να αποδώσει μετά τη διέγερση 20 έως 60 % θετικά κύτταρα. Η χρήση του Διεγερτικού, Αρ. Καταλόγου 840-15, όπως περιγράφεται παραπάνω, πρέπει να αποδίδει αυξημένη απόκριση στο αίμα των υγιών ατόμων.

Αυξημένες τιμές έχουν αναφερθεί όταν το συνολικό αίμα αντικαθίσταται στο μίγμα αντίδρασης από εγκεφαλονωτιαίο υγρό από περιστατικά βακτηριδιακής μηνιγγίτιδας,⁴⁴ ή από αρθρικό υγρό από περιστατικά πυρογενούς αρθρίτιδας.⁵³ Η χρήση άλλων σωματικών υγρών εκτός από συνολικό αίμα δεν έχει αξιολογηθεί πλήρως και επί του παρόντος δεν είναι εφικτό να αξιολογηθεί η χρησιμότητά τους με τα παρεχόμενα αντιδραστήρια.

Τα δεδομένα που λαμβάνονται από τη διαδικασία αυτή εξυπηρετούν μόνο ως βοήθημα στη διάγνωση και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις ή πληροφορίες.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

Μη διεγερμένο:

Μια εξέταση διεγερμένου NBT (επεξεργασία αίματος με βακτηριδιακό εκχύλισμα) μπορεί να εκτελεστεί ως θετικός μάρτυρας σε συνδυασμό ή μετά από την παρουσία εξέτασης μη διεγερμένου NBT, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολικές ανωμαλίες στη λειτουργία των ουδετερόφιλων. Περιγράφεται επίσης η εξέταση διεγερμένου NBT.

Επίταση του δείγματος και Παρασκευή Επιχρισμάτων:

1. Με μία πλαστική πιπέτα, μεταφέρετε 0,12 mL Διαλύματος NBT σε ένα φιαλίδιο, Αρ. Καταλόγου 840-50.
2. Προσθέστε 0,2 mL καλά αναμιγμένου ηπαρινισμένου αίματος. Αναμίξτε ήπια, αλλά καλά, γέροντας ελαφρά και "κυλώντας" το φιαλίδιο. Μην αναστρέψετε το φιαλίδιο. Πωματίστε σφιχτά.
3. Επώστε στους 37 °C επί 10 λεπτά. Αφαιρέστε και αφήστε το να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) επιπλέον 10 λεπτά.
4. Αναμίξτε το μίγμα ηπαρινισμένου αίματος-NBT και πάλι "κυλώντας" απαλά.
5. Με μία πλαστική πιπέτα, μεταφέρετε 50–75 μ L του μίγματος σε καθαρή υάλινη αντικειμενοφόρο.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Κατά την παρασκευή επιχρισμάτων, φροντίστε να ελαχιστοποιείτε την πρόκληση μηχανικών ζημιών στα λευκά αιμοσφαίρια.

6. Παρασκευάστε σχετικά παχύ επίχρισμα προκειμένου να μειώσετε τις μηχανικές ζημιές στα κύτταρα που περιέχουν φορμαζάνη, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία.^{6,34} Αφήστε το επίχρισμα να στεγνώσει στον αέρα.
7. Κατεργαστείτε το επίχρισμα με Χρωστική ACCUSTAIN Wright, Αρ. Καταλόγου WS 10, ως εξής:
 - α. Γεμίστε το επίχρισμα που έχει στεγνώσει με 1 mL χρωστικής επί 15 δευτερόλεπτα.
 - β. Στο γεμισμένο επίχρισμα προσθέστε 1 mL αποσταγμένου νερού και αφήστε το να σταθεί 30 δευτερόλεπτα (μεγαλύτερος χρόνος αυξάνει την ένταση της χρώσης).
 - γ. Ξεπλύνετε το επίχρισμα με νερό, αφήστε το να στεγνώσει και στυπώστε ή στεγνώστε στον αέρα.

Διεγερμένο:

Η διαδικασία αυτή μπορεί να εκτελεστεί ταυτόχρονα ή μετά από την εξέταση μη διεγερμένου NBT ως πιθανό βοήθημα για τον εντοπισμό μεταβολικών ανωμαλιών της λειτουργίας των ουδετερόφιλων (ανατρέξτε στην ενότητα "Προοριζόμενη Χρήση").

Επίταση του δείγματος και Προετοιμασία επιχρισμάτων:

1. Μεταφέρετε 0,1 mL διαλύματος NBT σε ένα φιαλίδιο, Αρ. Καταλόγου 840-50.
2. Με μια πλαστική πιπέτα, προσθέστε 0,05 mL ηπαρινισμένου αίματος και 5 μ L Διαλύματος Διεγερτικού. Αναμίξτε ήπια, αλλά καλά, γέροντας ελαφρά και "κυλώντας" το φιαλίδιο. Πωματίστε σφιχτά.
3. Προχωρήστε στα βήματα 3 έως 7 όπως και στην "Διαδικασία (Μη διεγερμένο)" και συνεχίστε με την ενότητα "Εξέταση με Μικροσκόπιο και Καταμέτρηση".

Αυξημένες τιμές απουσία βακτηριδιακής λοίμωξης αναφέρονται σε:

Φυσιολογικά βρέφη, ηλικίας μικρότερης των δυο μηνών (επίσης νεογέννητα και πρώιμα βρέφη)^{7,35,42,55,59}

Κύηση¹⁶

Σύνδρομο Chekiak-Higashi⁶⁰

Ιδιοπαθή μυελοσκληρύωση^{15,43}

Ατελή οστεογένεση²¹

Αιμορροφιλία²¹

Νόσο του Hodgkin's ή άλλα λεμφώματα^{17,61}

Σύνδρομο Behcet's⁶²

Φλεγμονώδη εντερική πάθηση⁴

Τυφοειδή/παρτυφοειδή ανοσοποίηση (εντός λίγων ωρών)^{13,33,60}

Θεραπεία στρεπτοκινάσης²²

Ιογενή μηνιγγίτιδα⁵⁴

Ιογενή ηπατίτιδα⁶³

Μετά από αιμοκάθαρση²⁰

Ασθενείς που λαμβάνουν αντισυλληπτικά από το στόμα⁶⁴ (σύμφωνα με ορισμένες αναφορές τα αντισυλληπτικά αυτού του είδους δεν προκαλούν παρενέργειες)^{45,46}

Έμφραγμα του μυοκαρδίου⁶⁵

Μελέτες επαναληψιμότητας εκτελέστηκαν από τον ίδιο τεχνολόγο σε αίμα που λήφθηκε από 25 ασθενείς, χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε. Τα αποτελέσματα εις διπλούν, που εκφράζονται ως ποσοστό των θετικών σε NBT κυττάρων, κυμαίνονταν μεταξύ 2 και 90 %. Η χρήση της στατιστικής μεθόδου των ελάχιστων τετραγώνων απέφερε συντελεστή συσχέτισης της τάξεως του 0,9834 μεταξύ των επαναληψεων.

Αν τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν αποκλίνουν από τα αναμενόμενα, επικοινωνήστε με την Τεχνική Εξυπηρέτηση της Sigma-Aldrich για βοήθεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Park BH, Fikrig SM, Smithwick EM: Infection and nitroblue-tetrazolium reductions by neutrophils: a diagnostic aid. *Lancet* 2:532, 1968
- Matula G, Paterson PY: Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. *N Engl J Med* 285:311, 1971
- Freeman R, King B: Technique for the performance of the nitroblue tetrazolium (NBT) test. *J Clin Pathol* 25:912, 1972
- Baehner RL, Nathan DG: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 278:971, 1968
- Wenger ME, Bole GG: Nitroblue tetrazolium dye reduction by peripheral leukocytes from rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients measured by a histochemical and spectrophotometric method. *J Lab Clin Med* 82:513, 1973
- Gifford RH, Malawista SE: The nitroblue tetrazolium reaction in human granulocytes adherent to a surface. *Yale J Biol Med* 45:119, 1972
- Park BH: The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. *J Pediatr* 78:376, 1971
- Ochs HD, Igo RP: The NBT slide test: A simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J Pediatr* 83:77, 1973
- Bjorksten B: The influence of technical factors on the NBT test. *Scand J Haematol* 12:46, 1974
- Gordon PA, Stuart J, Lee TR, Breeze GR, Pugh RNH: The cytocentrifuge NBT test. *J Clin Pathol* 28:674, 1975
- Belcher RW, Czarnetzki B: A simple screening test for chronic granulomatous disease. *Am J Clin Pathol* 60:450, 1973
- Rothwell DJ, Doumas BT: The effect of heparin and EDTA on the NBT test. *J Lab Clin Med* 85:950, 1975
- Silverman EM, Ryden SE: The nitroblue tetrazolium (NBT) test: A simple, reliable method and a review of its significance. *Am J Med Technol* 40:151, 1974
- Bittner SJ, Kieff E, Windhorst D, Meier P: The use of the unstimulated nitroblue tetrazolium test as a routine screening test for bacterial infection in an adult population: A reassessment. *Am J Clin Pathol* 60:843, 1973
- Segal AW, Trustey SF, Levi AJ: Re-evaluation of nitroblue tetrazolium test. *Lancet* 2:879, 1973
- Feigin RD: NBT test in the diagnosis of febrile patients. *N Engl J Med* 285:347, 1971
- Feigin RD, Shackelford PG, Choi SC, Flake KK, Franklin FA Jr, Eisenberg CS: Nitroblue tetrazolium dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. *J Pediatr* 78:230, 1971
- Douwes FR: Clinical value of NBT test. *N Engl J Med* 287:822, 1972
- Gly-Jones R: NBT test. *Lancet* 2:161, 1973
- Winchester JF, Gordon AM, Rowan RM, Lindsay RM, Black DA: Interpretation of the nitroblue tetrazolium test in regularly dialyzed patients. *Lancet* 2:292, 1973
- Humbert JR, Marks MI, Hathaway WE, Thoren CH: The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infections. *Pediatrics* 48:259, 1971
- Hawkins J: The NBT test in systemic bacterial infection. *Lancet* 1:1065, 1973
- Editorial: Nitroblue tetrazolium: A routine test? *Lancet* 2:909, 1971
- Steigbigel RT, Johnson PK, Remington JS: The nitroblue tetrazolium reduction test versus conventional hematology in the diagnosis of bacterial infection. *N Engl J Med* 290:235, 1974
- Editorial: Another look at the NBT test. *Lancet* 1:664, 1974
- Bjorksten B: The nitroblue tetrazolium (NBT) test – A methodological and clinical study. *Umea University Medical Dissertations*, No. 15, 1974

- Lenny W, Suvatte V, Tuchinda S: NBT test in overwhelming bacterial infection. *Lancet* 2:465, 1974
- Segal AW: Nitroblue-tetrazolium tests. *Lancet* 2:12438, 1974
- Freeman R, King B: Nitroblue-tetrazolium tests. *Lancet* 1:104, 1975
- Charette R, Komp DM: NBT test and incubation temperature. *N Engl J Med* 287:991, 1972
- Hellum KB, Solber CO: Influence of anticoagulants on the nitroblue-tetrazolium test. *Scand J Infect Dis* 5:67, 1973
- Hohn DC, Lehrer RI: Mechanism of the heparin effect on the nitroblue-tetrazolium slide test. *Infect Immun* 10:772, 1974
- Gordon AM, Rowan RM, Brown T, Carson HG: Routine application of the nitroblue tetrazolium test in the clinical laboratory. *J Clin Pathol* 25:52, 1973
- Feigin RD: Personal Communication
- Bjorksten B: The NBT test using venous and capillary blood. *Scand J Haematol* 11:270, 1973
- Stuart J, Simpson JS: Dehydrogenase enzyme cytochemistry of unfixed leucocytes. *J Clin Pathol* 23:517, 1970
- Patterson BB: Nitroblue tetrazolium reduction in neutrophils – a modification using the buffy coat. *Lab Med* 6:50, 1975
- Staples WG, Jacobs P: Still more on NBT technic. *N Engl J Med* 290:572, 1974
- Shousha S, Kamel K: Nitroblue tetrazolium test in children with kwashiorkor with a comment on the use of latex particles in the test. *J Clin Pathol* 25:494, 1972
- Andersen BR: NBT test in malaria. *Lancet* 2:317, 1971
- Chretien JH, Garagusi VF: NBT test in parasitic disease. *Lancet* 2:549, 1971
- Humbert JR, Kurtz ML, Hathaway WE: Increased reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of newborn infants. *Pediatrics* 45:125, 1970
- Ng RP, Chan TK, Todd D: NBT test – False-negative and false-positive results. *Lancet* 1:1341, 1972
- Esposito R, DeLalla F: NBT test in bacterial meningitis. *Lancet* 1:747, 1972
- Arrowsmith D, Morin RJ: Oral contraceptives and the NBT test. *Lancet* 1:148, 1973
- Ramsdale EH, Mowbray JF: Positive NBT tests in pregnancy. *Lancet* 1:1246, 1973
- Silverman EM, Reed RE: The nitroblue tetrazolium test in lymphoma. *Am J Clin Pathol* 59:198, 1973
- Pujol-Moix MN: NBT test in malaria. *Lancet* 2:871, 1971
- Miller DR, Kaplan HG: Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. *Pediatrics* 45:861, 1970
- Cooper MR, Dechatelet LR, Lavia MF, McCall CE, Spurr CL, Baehner RL: Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity. *J Clin Invest* 49:21a, 1970
- Dejesus M Jr, Fikrig S, Detwiler T: Phagocytosis-stimulated nitroblue tetrazolium reduction by platelets. *J Lab Clin Med* 80:117, 1972
- Park BH, Biggar WD, L'Esperance P, Good RA: NBT test on monocytes of neutropenic patients. *Lancet* 1:1064, 1972
- Gupta RC, Steigerwald JC: Nitroblue tetrazolium test in the diagnosis of pyogenic arthritis. *Ann Intern Med* 80:723, 1974
- Rubenstein A, Pelet B: False-negative NBT tests due to transient malfunction of neutrophils. *Lancet* 1:382, 1973
- Bjorksten B, Ekstrand T, Gothefors L, Ostberg Y: The nitroblue tetrazolium (NBT) test and white blood cell count in acute throat infections. *Scand J Infect Dis* 7:45, 1975
- Chretien JH, Garagusi VF: NBT test and steroid therapy. *Lancet* 2:653, 1972
- Lehrer RI: Defective candidacidal activity of leukocytes from patients with systemic candidiasis. *Clin Res* 18:443, 1970
- Pujol-Moix MN: Nitroblue-tetrazolium reducing capacity of neutrophils in diabetes. *N Engl J Med* 289:920, 1973
- Cocchi P, Mori S, Becattini A: NBT tests in premature infants. *Lancet* 2:1426, 1969
- Grush OC, Mauer AM: Neutrophil function and NBT dye reduction. *Lancet* 2:383, 1969
- Soonatrakul W, Andersen BR: Nitroblue tetrazolium test in lymphomas. *N Engl J Med* 288:218, 1973
- Okuda K, Tanokoro I, Sekido M: The NBT test in Bechet's syndrome. *N Engl J Med* 290:915, 1974
- Hellum KB, Solbert CO: Positive NBT test in acute viral hepatitis. *Lancet* 1:1181, 1973
- Norden CW, Reese R: Oral contraceptives and NBT test. *N Engl J Med* 297:254, 1972
- Lauter CP, el Khatib MR, Rising JA, Robin E: The nitroblue tetrazolium test and acute myocardial infarction. A study in patients. *Ann Intern Med* 79:59, 1973

To Vacutainer αποτελεί σήμα κατατεθέν της Becton, Dickson and Company

To Ficoll αποτελεί σήμα κατατεθέν της Pharmacia

Η Sigma-Aldrich, Inc. εγγυάται ότι τα προϊόντα της συμμορφώνονται με τις πληροφορίες που περιέχονται σε αυτή και σε άλλες εκδόσεις της Sigma-Aldrich. Ο αγοραστής πρέπει να καθορίζει την καταλληλότητα του(ων) προϊόντος(ων) για τη συγκεκριμένη χρήση τους. Πιθανόν να ισχύουν πρόσθετοι όροι και συνθήκες. Βλ. αντίστοιχη πλευρά του τιμολόγιου ή της ταινίας συσκευασίας για επιπλέον όρους και συνθήκες πώλησης.

Αρ. Διαδικασίας 840

Προηγούμενη αναθεώρηση: 2003-10

Αναθεωρημένη: 2010-06



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

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765

Τεχνική υπηρεσία: χρωστική κλήση +1 314 771 3122

ή e-mail στο clintech@sial.com

Για παραγγελία: χρωστική κλήση +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

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