



SIGMA-ALDRICH®

**NAFTOL AS-D CLOROACETATO
ESTERASI E
α-NAFTIL ACETATO ESTERASI**
(Procedura n. 91)

USO PREVISTO

Per la rivelazione citologica di esterasi leucocitarie specifiche e non. I reagenti per esterasi sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro".

Le esterasi cellulari sono ubiquitarie e apparentemente rappresentano una serie di enzimi diversi che agiscono su determinati substrati. In condizioni di reazione ben definite, è possibile determinare i tipi di cellule emopoietiche utilizzando substrati specifici di esterasi. Le metodiche descritte forniscono agli ematologi gli strumenti necessari per distinguere i granulociti dai monociti.^{1,9}

Per eseguire l'analisi occorre incubare le pellicole di sangue o midollo osseo o i preparati di tessuto per microscopia con naftol AS-D cloroacetato (NCAE) oppure con α-naftil acetato (NAE) in presenza di sali di diazonio appena formati. L'idrolisi enzimatica delle concatenazioni di estere sprigiona i composti di naftolo liberi. Questi ultimi si accoppiano ai sali di diazonio e formano depositi molto colorati in corrispondenza dei siti di attività enzimatica.

Le procedure più recenti, comprese quelle elaborate da Sigma-Aldrich, utilizzano sali di diazonio stabili, che si formano facendo reagire una arilamina con nitrito di sodio in un terreno acido.⁹ Il cloruro di diazonio che ne deriva (generalmente instabile) può essere trattato con composti quali cloruro di zinco, solfato di zinco o naftalene-1-6-disolfonato, in modo da formare sali stabili. Questi stabilizzatori potrebbero esercitare un effetto inibitorio marcato su alcuni sistemi enzimatici, mentre i cloruri di diazonio sono meno inibitori.⁹ Per questa ragione Sigma-Aldrich mette ora a disposizione le soluzioni stabili di Fast Red Violet LB base, Fast Blue BB base e nitrito di sodio per la citochimica dell'esterasi. Allo scopo di semplificare ulteriormente queste procedure, vengono fornite anche soluzioni stabili di naftol AS-D cloroacetato e α-naftil acetato. Potendo usufruire di soluzioni già stabili, il cliente potrà dedicarsi alla preparazione di un volume di reagente sufficiente per il proprio lavoro, evitando inutili sprechi.

REAGENTI

SOLUZIONE DI NAFTOL AS-D CLOROACETATO, n. di catalogo 91-1

Naftol AS-D cloroacetato 8 mg/ml; con stabilizzatore.

SOLUZIONE FAST RED VIOLET LB BASE, n. di catalogo 91-2

Fast red violet LB base 15 mg/m; in 0,4 mol/l di acido cloridrico con stabilizzatore.

TRIZMAL™ 6,3 CONCENTRATO, n. di catalogo 91-3

TRIZMA® maleato 1 mol/l; con tensioattivo. Con pH 6,3 ± 0,1 a 25°C.

SOLUZIONE DI NITRITO DI SODIO, n. di catalogo 91-4

Nitrito di sodio 0,1 mol/l.

SOLUZIONE CITRATA, n. di catalogo 91-5

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

SOLUZIONE DI α-NAFTIL ACETATO, n. di catalogo 91-6

α-naftil acetato 12,5 mg/m; in soluzione di metanolo con stabilizzatori.

SOLUZIONE FAST BLUE BB BASE, n. di catalogo 91-7

Fast blue BB base 15 mg/ml; in 0,4 mol/l di acido cloridrico con stabilizzatori.

TRIZMAL™ 7,6 CONCENTRATO, n. di catalogo 91-8

TRIZMA® maleato 1 mol/l; con tensioattivo. Con pH 7,6 ± 0,1 a 25°C.

SOLUZIONE EMATOSSILINA DI GILL 3, n. di catalogo GHS-3
Ematossilina certificata 6,0 g/l; iodato di sodio 0,6 g/l; solfato di alluminio 52,8 g/l; con stabilizzatori.

SOLUZIONE DI FLUORURO DI SODIO, n. di catalogo 91-9
Fluoruro di sodio 20 g/l

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

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

Il TRIZMAL™ 6,3 concentrato, il TRIZMAL™ 7,6 concentrato e la soluzione citrata sono idonei all'uso in

assenza di crescita batterica. Gli altri reagenti sono stabili sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

DETERIORAMENTO

Scartare il TRIZMAL™ concentrato e la soluzione citrata se la crescita batterica è evidente. Scartare la soluzione ematossilina di Gill 3 se diventa marrone (ossidazione all'aria) oppure viola (perdita di acidità).

PREPARAZIONE

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

Soluzione fissante di citrato-acetone-formaldeide: in 25 ml di soluzione citrata (n. di catalogo 91-5) aggiungere 65 ml di acetone e 8 ml di formaldeide al 37%. Versare la miscela in un flacone di vetro e richiudere con un tappo. Conservare in frigorifero (2–8°C). Portare a temperatura ambiente (18–26°C) prima dell'uso. La soluzione rimane stabile fino a 4 settimane se conservata perfettamente chiusa, in frigorifero.

PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A.)

La soluzione di naftol AS-D cloroacetato è IRRITANTE. Può formare perossidi esplosivi. Può causare sensibilizzazione in caso di contatto con la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Indossare indumenti protettivi idonei.

La soluzione Fast Red Violet LB base è TOSSICA. Nociva per ingestione. Tossica per inalazione. Causa ustioni. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Organi colpiti: fegato e reni.

TRIZMAL™ 6,3 concentrato. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

La soluzione di α-naftil acetato è INFIAMMABILE e TOSSICA. Tossica per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Irritante per gli occhi e la cute. Tossica: pericolo di effetti irreversibili per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

La soluzione Fast Blue BB base è TOSSICA. Nociva per ingestione. Tossica per inalazione. Causa ustioni. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Organi colpiti: fegato e reni.

La soluzione ematossilina di Gill 3 è NOCIVA. Nociva per ingestione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

L'acetone è INFIAMMABILE e IRRITANTE. Irritante per gli occhi. L'esposizione ripetuta può provocare cute secca e screpolata. L'inalazione dei vapori può indurre sonnolenza e vertigini. Conservare il contenitore in un ambiente adeguatamente ventilato. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Organi colpiti: fegato e reni.

Soluzione di fluoruro di sodio al 2%. Attenzione: evitare il contatto e l'inalazione. Organi colpiti: reni e ossa.

La soluzione di formaldeide è TOSSICA. Tossica per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Causa ustioni. Prove insufficienti di effetti cancerogeni. Può causare sensibilizzazione in caso di contatto con la cute. Può causare danni genetici ereditari. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Utilizzare solo in ambienti adeguatamente ventilati.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.E.)

La soluzione di naftol AS-D cloroacetato è IRRITANTE. Può formare perossidi esplosivi. Può causare sensibilizzazione in caso di contatto con la cute. Mantenere i contenitori ben

chiusi. Indossare indumenti protettivi idonei.

La soluzione Fast Red Violet LB base è NOCIVA. Nociva per ingestione.

TRIZMAL™ 6,3 concentrato. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

La soluzione di α-naftil acetato è TOSSICA. Infiammabile. Tossica per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Tossica: pericolo di effetti irreversibili per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Irritante per gli occhi e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

La soluzione Fast Blue BB base è NOCIVA. Nociva per ingestione.

La soluzione ematossilina di Gill 3 è NOCIVA. Nociva per ingestione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

L'acetone è FACILMENTE INFIAMMABILE e IRRITANTE. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi. L'esposizione ripetuta può provocare cute secca e screpolata. L'inalazione dei vapori può indurre sonnolenza e vertigini. Conservare il contenitore in un ambiente adeguatamente ventilato. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico.

Soluzione di fluoruro di sodio al 2%. Non respirare i vapori. Evitare il contatto con la cute e gli occhi.

La soluzione di formaldeide è TOSSICA. Tossica per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Causa ustioni. Prove insufficienti di effetti cancerogeni. Può causare sensibilizzazione in caso di contatto con la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Utilizzare solo in ambienti adeguatamente ventilati.

PROCEDURE

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

È possibile utilizzare pellicole di sangue, midollo osseo, preparati per microscopia e preparati per centrifuga sia con l'α-naftil acetato esterasi che con la naftol AS-D cloroacetato esterasi. Come anticoagulante si dovrà utilizzare EDTA o eparina.¹⁰ Con la naftol AS-D cloroacetato esterasi si possono utilizzare sezioni di tessuto congelate oppure sparaffinate. L'α-naftil acetato esterasi produce risultati soddisfacenti sulle sezioni di tessuto congelate.¹¹ È possibile fissare le pellicole di sangue o midollo osseo e conservarle a temperatura ambiente (18–26°C) per svariate settimane oppure non fissare le pellicole e conservarle per svariate giorni, senza mutazioni apprezzabili dell'attività.^{5,10} Non trasportare il sangue intero per l'analisi in altri laboratori. Trasportare vetrini fissati o non fissati. Durante il tragitto, i vetrini devono essere refrigerati costantemente. Prima di fissare le pellicole, lasciarle ad asciugare per almeno 1 ora.

MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Acetone, Reagente ACS
Formaldeide al 37%, ACS

Soluzione di fluoruro di sodio, n. di catalogo 91-9 (necessaria per l'α-naftil acetato esterasi con la procedura di inibizione con fluoruro).

LIMITI DELLA PROCEDURA

Le procedure descritte sono effettuate a 37°C. Se i reagenti non raggiungono questa temperatura, si otterranno reazioni deboli o negative. Si consiglia di controllare la temperatura con un termometro di precisione. A questo proposito, i risultati garantiti dal bagnomaria termoregolato sono migliori rispetto ai risultati che si possono ottenere con un'incubatrice ad aria calda. Per le analisi citochimiche degli enzimi, preferire il bagnomaria. Poiché il passaggio del calore è più rapido attraverso il vetro rispetto alla plastica, preferire vaschette Coplin di vetro.

Molti sistemi enzimatici sono sensibili a tracce minime di detergente. Per prevenire gli effetti del detergente sugli enzimi cellulari, lavare le attrezzature in vetro con candeggina diluita, quindi risciacquare accuratamente con abbondante acqua deionizzata.

Il sistema di fissaggio descritto nel paragrafo "Reagenti" contiene formaldeide. A meno che il fissante non venga rimosso completamente attraverso un risciacquo energico, i residui di aldeide (siano essi concentrati sui vetrini asciugati all'aria oppure rimasti come tracce sui vetrini bagnati) eventualmente introdotti nel sistema di incubazione possono provocare l'inibizione dell'enzima. Per prevenire la perdita della pellicola di sangue durante il risciacquo, indirizzare il flusso dell'acqua verso il vetrino al di sopra dell'estremità sottile. Sciacquare tutti e due i lati del vetrino.

In un certo senso, i risultati dipendono da un'interpretazione soggettiva. Ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli di normalità.

I dati generati da questa procedura sono da utilizzarsi soltanto a sostegno della diagnosi e devono essere valutati congiuntamente ad altri esami e dati diagnostici.

NOTE

Si invitano gli utenti dei kit Sigma n. 390-A e 91-C a prestare la massima attenzione durante l'uso dei prodotti TRIZMA® tampone concentrato (numeri di catalogo 91-3 e 90-3C) in quanto si tratta di prodotti non intercambiabili. L'eventuale uso del tampone errato provocherà una reazione negativa.

PROCEDURA

Le procedure descritte vengono effettuate a 37°C.

PROCEDURA PER NAFTOL AS-D CLOROACETATO ESTERASI

1. Preriscaldare a 37°C una quantità di acqua deionizzata sufficiente per il substrato. Verificare la temperatura prima dell'uso.
2. Un attimo prima del fissaggio, aggiungere 1 ml di soluzione di nitrato di sodio in 1 ml di soluzione Fast Red Violet LB base, all'interno di una provetta per analisi. Mescolare delicatamente capovolgendo la provetta e lasciare riposare per 2 minuti. Evitare che le bollicine di gas si sviluppino attivamente.
3. Aggiungere la soluzione descritta al punto 2 in 40 ml di acqua deionizzata preriscaldata.
4. Aggiungere 5 ml di TRIZMAL™ 6,3 tampone concentrato (vedere "Nota").
5. Aggiungere 1 ml di soluzione di naftol AS-D cloroacetato. La soluzione dovrebbe diventare rossa. Mescolare con cura e versare in una vaschetta Coplin.
6. Portare la soluzione di citrato-acetone-formaldeide a temperatura ambiente (23–26°C). Fissare i vetrini immergendoli nella soluzione fissante per 30 secondi.
7. Sciacquare i vetrini accuratamente in acqua deionizzata corrente per 45-60 secondi, quindi immergerli nella soluzione descritta al punto 5. Evitare che i vetrini si asciughino.
8. Incubare per 15 minuti a 37°C, al riparo dalla luce.
9. Trascorsi 15 minuti, estrarre i vetrini e sciacquarli accuratamente in acqua deionizzata per almeno 2 minuti.
10. Applicare la colorazione di contrasto con soluzione ematosilina di Gill 3 per 2 minuti.
11. Sciacquare in acqua di rubinetto e asciugare all'aria.
12. Esaminare al microscopio. Se è necessario coprire i vetrini, utilizzare esclusivamente un mezzo di montaggio acquoso.

NOTE

1. Se si utilizzano vaschette del tipo Columbia, è necessario dividere i volumi di reagente per 5.
2. Se il substrato (vedere punto 5) sembra torbido, portare la soluzione a temperatura ambiente (23–26°C) e mescolare accuratamente.
3. Se i vetrini sono stati fissati in precedenza e successivamente conservati, è possibile ignorare la fase di fissaggio (punti 6 e 7) e iniziare la colorazione dei vetrini asciutti, prefissati, a partire dal punto 8.

PROCEDURA PER α-NAFTIL ACETATO ESTERASI

1. Preriscaldare a 37°C una quantità di acqua deionizzata sufficiente per il substrato. Verificare la temperatura prima dell'uso.
2. Un attimo prima del fissaggio, aggiungere 1 ml di soluzione di nitrato di sodio in 1 ml di soluzione Fast Blue BB base, all'interno di una provetta per analisi. Mescolare delicatamente capovolgendo la provetta e lasciare riposare per 2 minuti. Il colore cambierà da marrone sporco a giallo intenso. Evitare che le bollicine di gas si sviluppino attivamente.
3. Aggiungere la soluzione descritta al punto 2 in 40 ml di acqua deionizzata preriscaldata.
4. Aggiungere 5 ml di TRIZMAL™ 7,6 tampone concentrato.
5. Aggiungere 1 ml di soluzione di α-naftil acetato. La soluzione dovrebbe diventare verdognola. Mescolare con cura e versare in una vaschetta Coplin.
6. Portare la soluzione di citrato-acetone-formaldeide a temperatura ambiente (23–26°C). Fissare i vetrini immergendoli nella soluzione fissante per 30 secondi.

Scuotere i vetrini in maniera energica per almeno 5 secondi.

7. Sciacquare i vetrini accuratamente in acqua deionizzata corrente per 45–60 secondi, quindi collocarli nella soluzione descritta al punto 5. Evitare che i vetrini si asciughino.
8. Incubare per 30 minuti a 37°C, al riparo dalla luce.
9. Trascorsi 30 minuti, estrarre i vetrini e sciacquarli accuratamente in acqua deionizzata corrente per almeno 2 minuti.
10. Applicare la colorazione di contrasto con soluzione ematosilina di Gill 3 per 2 minuti.
11. Sciacquare in acqua di rubinetto e asciugare all'aria.
12. Esaminare al microscopio. Se è necessario coprire i vetrini, utilizzare esclusivamente un mezzo di montaggio acquoso.

NOTE

1. Se si utilizzano vaschette del tipo Columbia, è necessario dividere i volumi di reagente per 5.
2. Se il substrato (vedere punto 5) sembra torbido, portare la soluzione a temperatura ambiente (23–26°C) e mescolare accuratamente.
3. Se i vetrini sono stati fissati in precedenza e successivamente conservati, è possibile ignorare la fase di fissaggio (punti 6 e 7) e iniziare la colorazione dei vetrini asciutti, prefissati, a partire dal punto 8.

PROCEDURA PER ESTERASI CON DOPPIO COLORANTE

1. Eseguire la procedura per α-naftil acetato esterasi, secondo la modalità descritta. Non applicare la colorazione di contrasto.
2. Sciacquare i vetrini in acqua deionizzata per 5 minuti.
3. Eseguire l'analisi naftol AS-D cloroacetato esterasi secondo le modalità descritte nei punti 1-12 della procedura. Ignorare il punto 6.

PROCEDURA PER α-NAFTIL ACETATO ESTERASI E INIBIZIONE CON FLUORURO

Sebbene l'α-naftil acetato esterasi sia rinvenibile principalmente in cellule di linea monocitica (se la procedura è eseguita secondo le istruzioni fornite), va sottolineato che i megacariociti e i precursori dell'eritroide risultano positivi a questo enzima.¹² Anche i linfociti e alcuni granulociti maturi possono risultare occasionalmente positivi.⁵ Per una differenziazione definitiva di queste cellule dai monociti, nel sistema di incubazione viene inglobato il fluoruro di sodio. In presenza di questo composto, l'enzima monocitico viene reso inattivo.¹³ La procedura descritta di seguito può essere adottata per l'esecuzione del test di inibizione con il fluoruro.

1. Aggiungere 2 ml di soluzione di nitrato di sodio in 2 ml di soluzione Fast Blue BB base. Mescolare delicatamente capovolgendo il contenitore. Lasciare riposare per 2 minuti.
2. Assegnare a 2 beaker le etichette A e B rispettivamente, quindi aggiungere i seguenti elementi:

	Beaker A	Beaker B
Acqua deionizzata preriscaldata a 37°C	40 ml	40 ml
Fast Blue BB diazotato (punto 1)	2 ml	2 ml
TRIZMAL™ 7,6 concentrato	5 ml	5 ml
Soluzione di α-naftil acetato	1 ml	1 ml
Soluzione di fluoruro di sodio	—	1 ml

3. Mescolare bene e versare in due vaschette Coplin con le etichette A e B.
4. Procedere secondo le istruzioni illustrate nei punti 6-12 della procedura per α-naftil acetato esterasi.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

METODO DI VALUTAZIONE

Esaminare la pellicola e selezionare un'area sottile con pochi eritrociti. I siti di attività della naftol AS-D cloroacetato esterasi saranno rappresentati da una granulazione rosso vivo, quelli dell'α-naftil acetato esterasi da una granulazione nera. Assegnare un voto compreso tra 0 e 4+, in base alla quantità e all'intensità dei singoli colori all'interno del citoplasma dei diversi tipi di cellule. Questa fase di valutazione è in un certo senso soggettiva. Nella tabella 1 viene suggerito un formato per l'interpretazione dei risultati. Le conclusioni sono in funzione della presenza o assenza della colorazione.

TABELLA I Valutazione		
Voto cellula	Intensità della colorazione	Interpretazione
0	Nulla	—
1+	Da debole a moderata	±
2+	Da moderata a forte	+
3+	Forte	+
4+	Brillante	+

OSSERVAZIONI ATTESE:

NAFTOL AS-D CLOROACETATO ESTERASI

(Fast Red Violet LB) – L'enzima è in genere considerato specifico delle cellule di stirpe granulocitica. I siti di attività presentano una granulazione rosso vivo. L'attività è debole o addirittura nulla in monociti e linfociti.

α-NAFTIL ACETATO ESTERASI

(Fast Blue BB) – L'enzima è presente in prevalenza nei monociti, nei macrofagi e negli istiociti, mentre è praticamente assente nei granulociti. Nei monociti dovrebbe comparire una granulazione nera. Occasionalmente si può osservare una certa attività enzimatica nei linfociti.

α-NAFTIL ACETATO ESTERASI E INIBIZIONE CON FLUORURO

Tutte le cellule di stirpe monocitica risulteranno negative all'attività enzimatica, ad eccezione degli istiociti differenziati o dei macrofagi specializzati presenti nel tessuto, i quali potrebbero essere resistenti al fluoruro di sodio.¹¹

ESTERASI CON DOPPIA COLORAZIONE

Nei campioni sottoposti alla procedura di doppia colorazione, i granulociti saranno rappresentati da una granulazione rossa e i monociti da una granulazione nera.

NOTA È possibile utilizzare la soluzione Fast Blue BB base (n. di catalogo 91-7) al posto della soluzione Fast Red Violet LB base (n. di catalogo 91-2) nel caso in cui sia da preferirsi una granulazione blu nella naftol AS-D cloroacetato esterasi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il sistema di reagenti deve essere monitorato tramite l'uso di vetrini di controllo positivi o negativi.

I vetrini di controllo positivi possono essere preparati utilizzando campioni leucemici o linee cellulari specifiche notoriamente positive. Le linee cellulari possono essere fornite su richiesta dall'ATCC (American Type Culture Collection), moltiplicate in coltura, congelate e conservate in azoto liquido. Le linee cellulari idonee ai controlli positivi sono: A-937, derivata da un linfoma istiocitico umano, per esterasi generica; HL-60, una linea promielocitica, per la naftol AS-D cloroacetato esterasi; Molt-4, derivata da una leucemia a cellule T, per l'α-naftil acetato esterasi. Consultare la documentazione fornita a corredo delle linee cellulari per un corretto uso.

In alternativa è possibile utilizzare anche sangue anti-coagulato proveniente da campioni non patologici (di preferenza con conteggio dei monociti aumentato se si utilizza la procedura per α-naftil acetato esterasi). Tenere presente tuttavia che questi campioni produrranno una colorazione meno intensa e un numero minore di cellule positive.

I vetrini negativi possono essere utilizzati come controlli negativi. In caso di mancata disponibilità, è possibile ottenere i risultati desiderati colorando un campione in una miscela di incubazione con il substrato omesso. Si consiglia comunque di utilizzare sempre controlli negativi.

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

BIBLIOGRAFIA

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 è un marchio registrato e TRIZMAL è un marchio di fabbrica di Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO (U.S.A.).

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. 91
Revisione precedente: 2003-02
Revisione: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD (Regno Unito)

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA) +1 314 771 5765
Assistenza tecnica: a carico del destinatario +1 314 771 3122
o tramite e-mail all'indirizzo clintech@sial.com
Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim (Germania) 49-7329-970