

## POUŽITÍ

Souprava Sigma-Aldrich Acid Phosphatase kit je určena k použití v cytologické demonstraci aktivity kyselých fosfatáz v leukocytech z krve, kostní dřevě a tkáňových dotykových preparátů. Reagencie kyselých fosfatáz jsou určeny k "diagnostice in vitro."

Použití substituovaných AS fosfátů naftolu ve spojení s diazoniovými solemi pro detekci kyselých fosfatáz v lidských leukocytech poprvé zaznamenali Goldberg a Barka.<sup>1</sup> Postup Sigma-Aldrich pro demonstraci tohoto leukocytárního enzymu je založen na použití naftolu AS-BI fosfátu a rychlého granátového soli GBC. Tato diazo-sloučenina byla vybrána, protože se spojuje rychle při kyselém pH a vytváří vysoce nerozpustné barevné usazeniny. Kyselina vinná slouží k demonstraci přítomnosti vianu odolné kyselých fosfatáz.

Podle postupu Sigma-Aldrich, krevní filmy jsou inkubovány v roztoku obsahujícím naftol AS-BI kyseliny fosforečné a rychlý granát GBC. Dvojitě filmy jsou opatřeny substrátem L(+)-obsahujícím vianem. Naftol AS-BI, uvolněný enzymatickou hydrolyzou se ihned spojuje s rychlým granátem GBC a tvoří nerozpustné kaštanově zbarvené usazeniny v místech aktivity. Buňky obsahující kyselou fosfatázu citlivou na kyselinu vinnou jsou zbarveny aktivně, kdežto mononukleární buňky obsahující fosfatázu odolnou kyselině vinné nejsou ovlivněny takovou úpravou.

## REAGENCIE

**CITRÁTOVÝ KONCENTRÁT**, katalogové č. 386-1

Citrátový pufr, 0,38 mol/l, pH 5,4, pokud je zředěný podle postupu.

**ROZTOK VIANU**, katalogové č. 386-2

L(+)-Vianový pufr, 0,67 mol/l, pH 5,2, pokud je zředěný podle postupu.

**ROZTOK ACETÁTU**, katalogové č. 386-3

Acetátový pufr, 2,5 mol/l, pH 5,2, pokud je zředěný podle postupu.

**ROZTOK NAFTOLU AS-BI KYSELINY FOSFOREČNÉ**, katalogové č. 386-4

Naftol jako kyselina dvojfosforečná, 12,5 mg/ml, v N,N'-dimetyl formamidu.

**SUL RYCHLÝ GRANÁT GBC**, katalogové č. 386-15

Sůl rychlý granát GBC sůl, purifikovaná, 15 mg/kapsle.

**ROZTOK KYSELÉHO HEMATOXYLINU**, katalogové č. 285-2

Hematoxylin, ověřený, 1 g/l, jodičnan sodný, síran hlinito-amonný a stabilizátory, pH 3,3 při 25 °C.

### SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Skladujte koncentrát citrátu, roztok vianu a roztok acetátu v ledničce (2-8 °C). Zlikvidovat, když se objeví zakalení.

Skladujte sůl Fast Garnet GBC Salt a Naphthol AS-BI Phosphoric Acid Solution v ledničce (2-8 °C). Barva Naftolu AS-BI roztoku kyseliny fosforečné se může měnit od světle žluté po tmavě žlutou. Reagencie jsou stabilní po dobu použitelnosti uvedené na lahvích.

Skladujte roztok Acid Hematoxylin Solution při pokojové teplotě (18-26 °C), pokud doba pro vhodné zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 5 minut.

Zředěný roztok citrátu je vhodný pro použití bez viditelného mikrobiálního růstu. Roztok citrát / aceton by se měl udržovat těsně uzavřený, pokud se nepoužívá. Připravujte denně čerstvý.

### PŘÍPRAVA:

Zředěný citrát se připravuje přidáním 2,0 ml koncentráту citrátu, katalogové č. 386-1 do 18,0 ml vody.

Fixativum Citrát/Aceton se připravuje přidáním 20,0 ml zředěného roztoku citrátu do 30,0 ml acetonu.

**POZNÁMKA:** Udržujte roztok citrát / aceton těsně uzavřený, pokud ho nepoužíváte. Připravovat denně čerstvý.

### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

### US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok citrátu je KOROZIVNÍ. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok vianu je DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Roztok acetátu. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok naftolu AS-BI kyseliny fosforečné je TOXICKÝ. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Může poškodit nenarozené dítě. Nevdechujte výparu. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody, pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Sůl rychlý granát GBC je TOXICKÁ. Může způsobit rakovinu. Nevdechujte prach. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody, pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Kyselina hematoxylinová je TOXICKÁ. Toxická při polknutím. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody, pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek).

Aceton je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výparu mohou způsobit otupělost a závrať. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Zasažené orgány: játra a ledviny.

### EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok citrátu je DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči a pokožku. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Roztok vianu je DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Roztok acetátu. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok naftolu AS-BI kyseliny fosforečné je TOXICKÝ. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Může poškodit nenarozené dítě. Nevdechujte výparu. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody, pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Sůl rychlý granát GBC je TOXICKÁ. Může způsobit rakovinu. Nevdechujte prach. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody, pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Kyselina hematoxylinová je ŠKODLIVÁ. Škodlivý při spolknutí.

Aceton je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výparu mohou způsobit otupělost a závrať. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

## POSTUP

### ODBĚR VZORKU:

Doporujeme se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Mohou se používat filmy krevní a kostní dřevě, dotekové tkáňové preparáty a cytotentrigické preparáty. Použijte EDTA nebo heparin jako antikoagulanty. Filmy krevní nebo kostní dřevě se mohou skladovat ustálené při pokojové teplotě (18-26 °C) několik týdnů nebo neustálené několik dnů bez patrné změny aktivity.<sup>2</sup> Neposílejte celou krev pro zkoušku v jiných laboratořích. Poslejte ustálená nebo neustálená sklička. Během přepravy by se sklička měla udržovat v chladu. Nechte filmy schnout asi hodinu před fixací.

### POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Aceton, ACS Reagencie

37 °C vodní lázeň

### POZNÁMKY:

Provedení zkoušky může být monitorováno zahrnutím krevních filmů připravených ze zdravého jedince. V nepřítomnosti kyseliny vinné všechny leukocyty demonstrují granulovaná místa aktivity. Když se inkubuje vianem, lze pozorovat náhodné granule v lymfocytech, ale všechny ostatní normálně se vyskytující buňky postrádají aktivitu.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

### POSTUP:

#### Fixace:

- Skličko fixujte v roztoku citrát / aceton po dobu 30 sekund při pokojové teplotě (18-26 °C).
- Promýt sklička deionizovanou vodou a nechat schnout nejméně 15 minut.

#### Barvení:

- Označit dvě 100ml kádinky A a B a přidat následující, promíchat po každém přidání:

	Kádinka A	Kádinka B
Voda, předehřátá na 37 °C	46,0 ml	44,0 ml
Roztok acetátu, katalogové č. 386-3	2,0 ml	2,0 ml
Naphthol AS-BI Phosphoric Acid, katalogové č. 386-4	2,0 ml	2,0 ml
Tartrate Solution katalogové č. 386-2	—	2,0 ml

- Přidat obsah jedné kapsle soli Fast Garnet GBC Salt, katalogové č. 386-15, do každé kádinky. Míchat magnetickým míchadlem po dobu 30-60 sekund.
- Rychle přefiltrovat roztoky přes papír Whatman č. 54 (nebo ekvivalentní) do separátně označených barvicích sklenic.
- Ohřát roztoky v barvicích sklenicích na 37 °C ve vodní lázni. Zkontrolovat, zda teplota je 37 °C před vložením sklíček.

- Umístit nejméně 2 dvojité fixované krevní filmy do každé nádoby obsahující filtrovaný roztok substrátu.
- Inkubovat sklička hodinu při 37 °C ve tmě.
- Vymout sklička a omývat 3 minuty deionizovanou vodou.
- Barvit v roztoku Acid Hematoxylin Solution, katalogové č. 285-2, po dobu 5 minut.
- Oplachovat sklička deionizovanou vodou po dobu 3 minut a nechat uschnout na vzduchu.
- Vyhodnotit mikroskopicky použitím olejové ponorné čočky (900X). Použití montážních médií na bázi rozpouštědla se nedoporučuje, protože mohou způsobit blednutí skvrn.

---

## CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

---

Vybarvené krevní filmy se obvykle hodnotí subjektivně na přítomnost nebo nepřítomnost vínanu odolného enzymu. V nepřítomnosti kyseliny vinné většina leukocytů demonstruje granulovaná místa aktivity. Když se inkubuje vínanem, lze pozorovat náhodné granule v lymfocytech a některých specializovaných makro- virech napadajících bakterie, jako např. Gaucherova buňka, epitelové a vlasové buňky.<sup>3</sup> V krevních nátěrech je označena pozitivní reakce přítomností více než dvou buněk s difúzní a intenzivní aktivitou, tj. více než 40 granulí.<sup>3</sup> K vyhodnocení Golgi zbarvení, se doporučují charakteristické lymfocyty odvozené od brzlíku (T-buňky), Sigma-Aldrich Postup č. 181.<sup>4</sup>

Aktivita kyselé fosfatázy se projevuje jako červenavé až tmavě červené granule v cytoplasmě většiny leukocytů.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měla by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

---

## REFERENCE

---

- Goldberg AF, Barka T: Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature 189:297, 1962
- Janckila A, Li CY a kol: The cytochemistry of the tartrate-resistant acid phosphatase-technical considerations. Am J Clin Pathol 70:45, 1978
- Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, str. 28, 119
- Starkweather WH, Small GJ, Hill Sk: A systematic approach to the cytochemical classification of acute leukemia. IN Laboratory Perspectives, Roger Maler, Inc., Arlington (NJ), issue No. 5, 1985, str 2

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. 386  
Předchozí revize: 2003-09  
Revidováno: 2005-01



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

SIGMA-ALDRICH, INC.  
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765  
Technické služby: 800-325-0250 nebo volat 314-771-3122  
nebo poslat e-mail na [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

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