

POUŽITÍ

Souprava kyselá fosfatáza Sigma-Aldrich je určena k použití v cytologické demonstraci aktivity kyselých fosfatáz v leukocytech z krve, kostní dřeně a tkáňových otiskových 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.¹ Postup Sigma-Aldrich pro demonstraci tohoto enzymu je založen na použití naftolu AS-BI fosfátu a rychlé granátové soli GBC. Tato diazosloučenina byla vybrána, protože se spojuje rychle při kyselém pH a vytváří vysoce nerozpustné barevné usazeniny.

Většina postupů, včetně těch, které provádí Sigma-Aldrich, využívají stabilní diazoniové sole. Ty se vytvářejí reakcí arylaminu s nitridem sodným v kyselém médiu.² Výsledný diazochlorid (obvykle nestabilní) lze upravovat sloučeninami, jako například chloridem zinečnatým, síranem zinečnatým nebo např. 1,6-disulfonátem, vytvářejícími stabilní sole. Tyto stabilizátory využívají výrazné inhibice některých enzymatických systémů, přičemž diazochloridy jsou méně inhibiční.² Proto společnost Sigma-Aldrich nyní poskytuje stabilní roztoky fast garnet GBC base a nitridu sodného pro cytochemii kyselých fosfatáz. Pro další zjednodušení této metody je připojen stabilní roztok naftol AS-BI fosfát. Tyto stabilní roztoky umožňují zákazníkovi upravovat množství pracovní reagentie podle potřeby a bez zbytků.

Podle postupu Sigma-Aldrich, krevní filmy jsou inkubovány v roztoku obsahujícím naftol AS-BI kyseliny fosforečné a čerstvě diazotizovaný rychlý granát GBC. Duplikátní filmy je možno upravit v roztoku s obsahem L(+)-vínanu. 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 tuto aktivitu postrádají. Mononukleární buňky obsahující fosfatázu rezistentní na kyselinu vinnou nejsou touto úpravou zasaženy.

REAGENCIE

ROZTOK NAFTOL AS-BI KYSELINA FOSFOREČNÁ, katalogové č. 387-1

Naftol AS-BI kyseliny fosforečné, 12,5 mg/mL.

ROZTOK FAST GARNET GBC BASE, katalogové č. 387-2

Fast garnet GBC báze, 7,0 mg/mL, v kyselině chlorovodíkové, 0,4 mol/l, se stabilizátorem.

ROZTOK ACETÁTU, katalogové č. 386-3

Acetátový pufr, 2,5 mol/l, pH 5,2 ± 0,1.

ROZTOK VÍVANU, katalogové č. 387-3

L(+)-Vínanový pufr, 0,335 mol/l, pH 4,9 ± 0,1.

ROZTOK NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 91-4

Nitrid sodný, 0,1 mol/l.

CITRÁTOVÝ ROZTOK, katalogové č. 91-5

Kyselina citrónová, 18 mmol/l, citrát sodný, 9 mmol/l, chlorid sodný, 12 mmol/l s detergentem, pH 3,6 ± 0,1.

ROZTOK HEMATOXYLINU, Gill č. 3, katalogové č. GHS-3

Certifikovaný hematoxylin, 6,0 g/l, jodičnan sodný, 0,6 g/l, síran hlinitý, 52,8 g/l a stabilizátory.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte roztok hematoxylinu při pokojové teplotě (18-26 °C). Chraňte před světlem. Štítek reagentie uvádí datum použitelnosti.

Skladujte roztoky naftol AS-BI kyseliny fosforečné, Fast Garnet GBC Base, acetátu, vínanu, nitridu sodného a citrátu při 2-8 °C.

Fixační roztok skladujte v lednici (2-8 °C). Před použitím zahřejte na 18-26 °C. Roztok je stabilní až 2 měsíce, je-li skladován těsně uzavřen v lednici. Jestliže zaznamenáte známky odpařování, fixační roztok zlikvidujte a připravte čerstvý.

ZHORŠENÍ:

Roztoky naftol AS-BI kyseliny fosforečné a vínanu je třeba zlikvidovat, jestliže se objeví zakalení.

Roztok citrátu je vhodný pro použití bez viditelného mikrobiálního růstu.

Zlikvidujte, pokud roztok hematoxylinu zhnědne (oxidací vzduchem) nebo zrudne (ztráta kyselosti).

PŘÍPRAVA:

Reagencie jsou dodávána připravená k okamžitému použití.

Připravte fixační roztok sloučením 25 mL citrátového roztoku, 65 mL acetonu a 8 mL 37 % formaldehydu. Umístěte do skleněné láhve a pevně uzavřete.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagentiemi. 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 Fast Garnet GBC Base je TOXICKÁ. Škodlivé při požití. Při vdechnutí jedovatý. Způsobuje popáleniny. Může způsobit rakovinu. 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). Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Roztok acetátu. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok vínanu 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 oblečení a rukavice.

Roztok Hematoxylin Gill 3 je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy a ochranu obličeje / očí. Zasažené orgány: Játra a ledviny. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Aceton je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit otupělost a závratě. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Formaldehyd je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Může způsobit dědičné genetické poškození. 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 ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok Fast Garnet GBC Base je TOXICKÁ. Škodlivé při požití. Může způsobit rakovinu. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok acetátu. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok vínanu 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 oblečení a rukavice.

Roztok Hematoxylin Gill 3 je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí.

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

Formaldehyd je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. 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 ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje 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 dřeně, otiskové tkáňové preparáty a cytocentrifugické preparáty. Jako antikoagulant slouží EDTA nebo heparin. Filmy krevní nebo filmy kostní dřeně se mohou skladovat ustálené při pokojové teplotě (18-26 °C) několik týdnů nebo neustálené několik dnů bez patrné změny aktivity.³ Neposílejte celou krev pro zkoušku v jiných laboratořích. Posílejte 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 reagentie
Formaldehyd, 37 %

POZNÁMKY:

Provedení zkoušky může být monitorováno zahrnutím krevních filmů připravených ze zdravého jedince.

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:

TESTOVACÍ PROCEDURA

- Předem zahřejte dostatečné množství deionizované vody pro denní potřebu na 37 °C. Před použitím zkontrolujte teplotu.
- Vyrovnejte teplotu fixačního roztoku na pokojovou teplotu (18-26 °C). Fixujte sklička ponořením do fixačního roztoku na dobu 30 sekund. Opláchněte řádně v deionizované vodě. Nenechejte sklička vyschnout.
- Do každé ze 2 zkumavek přidejte 0,5 mL roztoku Fast Garnet GBC Base a 0,5 mL roztoku nitridu sodného. Protřepáním opatrně promíchejte po dobu 30 sekund. Nechejte ustát na 2 minuty.
- Označte dvě 100mL kádinky A a B a za stálého míchání přidejte:

	Kádinka A	Kádinka B
Deionizovanou vodu, předehřátou na 37 °C	45 mL	45 mL
Diazotizovaného roztoku Fast Garnet GBC z kroku 3	1,0 mL	1,0 mL
Roztoku naftol AS-BI kyseliny fosforečné	0,5 mL	0,5 mL
Roztoku acetátu	2,0 mL	2,0 mL
Roztoku vínanu	—	1,0 mL

- Opatřete štítky A a B nádoby a přeneste roztoky z kádinek do příslušné nádoby Coplin. Ohřát roztoky v nádobách na 37 °C ve vodní lázni. Před vložením skliček zkontrolujte teplotu, zda dosahuje 37 °C.

6. Vložte sklíčka do nádob Coplin a inkubujte po dobu 1 hodiny při 37 °C teplé vodní lázni a chráňte před světlem.
7. Po jedné hodině propláchněte důkladně v deionizované vodě, potom proveďte kontrastní barvení na 2 minut v roztoku hematoxylinu, Gill č. 3.
8. Několik minut proplachujte v alkalické vodovodní vodě, aby se jádra zabarvila modře.
9. Usušte na vzduchu a mikroskopicky vyhodnoťte. Zakrytí krycími sklíčky se nedoporučuje, protože barvivo časem vybledne.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

VÝSLEDKY:

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 makrofázích, jako např. Gaucherova buňka, epitelové a vlasaté buňky. ⁴ V krevních nátěrech je označena pozitivní reakce přítomností více než dvou buněk s difúzní a intenzivní aktivitou, tj. více než 40 granulí. ⁴ K vyhodnocení Golgi zbarvení, se doporučují charakteristické lymfocyty odvozené od brzlíku (T-buňky), Sigma-Aldrich Postup č. 181. ⁵

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

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

REFERENCE

1. Goldberg AF, Barka T: Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature 189:297 1962
2. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
3. Janckila A, Li CY, et al: the cytochemistry of the tartrate-resistant acid phosphatase - Technical considerations. Am J Clin Pathol 70:45, 1978
4. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 28, 119
5. 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, p 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. 387
Předchozí revize: 2003-02
Revidováno: 2003-09



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

SIGMA-ALDRICH, INC.

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

Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122

nebo e-mailujte na clintech@sial.com

Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Německo 49-7329-970