

POUŽITÍ

Sigma-Aldrich Leukocyte Peroxidase (Myeloperoxidase) je určena k použití pro histochemickou demonstraci v leukocytární peroxidáze. Reagencie leukocytární peroxidázy jsou určeny k použití v "diagnostice in vitro."

Klasické metody cytochemické lokalizace myeloperoxidázy (MP) zahrnovaly použití benzidinu¹ nebo diaminobenzidinu.² V roce 1977, Hanker a kol.³ popsali použití p-fenylen-diaminu a pyrokatechinu pro detekci injektované křenové peroxidázy. Tento indikátorový systém je základem pro postup Sigma-Aldrich, pokud je myeloperoxidáza detekovaná použitím následující reakce:



REAGENCIE

TRIZMAL™ 6,3 KONCENTRÁT PUFRU, katalogové č. 90-3C

TRIZMA® maleate, 200 mmol/l. Chloroform přidán jako konzervační činidlo

REAGENCIE INDIKÁTORU PEROXIDÁZY, katalogové č. 390-1

p-fenylen-diamin diHCl (1 část) a katechol (2 částí).

ROZTOK KYSELINY HEMATOXYLINOVÉ, katalogové č. 285-2

Hematoxylin, přezkoušený, 1 g/l, pH 3,3 při 25 °C.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Trizmal™ 6,3 koncentrát pufru a roztok kyseliny hematoxylinové by se měly skladovat při pokojové teplotě (18–26 °C).

Reagencie indikátoru peroxidázy by se měla skladovat v ledničce (2–8 °C).

Roztok kyseliny hematoxylinové by se neměl vracet do původní nádoby po použití v nádobě Coplin.

Peroxid vodíku, 3 % ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem by se měl skladovat v ledničce (2–8 °C). Zlikvidovat, když se objeví zakalení.

Reagencie jsou stabilní do data použitelnosti.

ZHORŠENÍ:

Vyřadit Trizmal™ 6,3 koncentrát pufru, když se objeví zakalení.

Vyřadit roztok kyseliny hematoxylinové, když doba požadovaná pro vhodné zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 5 minut.

PŘÍPRAVA:

Trizmal™ 6,3 zředěný pufr se připravuje smícháním 1 objemu TRIZMAL™ 6,3 koncentrátu pufru , katalogové č. 90-3C, s devíti objemy deionizované vody. Použít jednu a znehodnotit.

Fixační roztok, 95 % (v/v) etanol, se připraví smícháním 5 ml 37 % formaldehydu se 45 ml 95 % etanolu. Připravovat denně čerstvý. Ukládat těsně uzavřený.

Peroxid vodíku, 3 %, ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku, se připravuje přidáním 1 dílu peroxidu vodíku, 30 %, k devíti dílům fosfátem pufovaného fyziologického roztoku pH 7,4. Měl by se připravovat čerstvý.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagentii. 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

Reagencie indikátoru peroxidázy je TOXICKÁ. Toxicity při vdechování, při styku s kůží a při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit přecitlivělost vdechutím a při kontaktu s pokožkou. Velmi toxická pro vodní organismy, může způsobit dlouhodobé negativní dopady ve vodním prostředí. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Tento materiál a jeho nádoba se musí likvidovat jako nebezpečný odpad. Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

TRIZMAL™ koncentrát pufru je ŠKODLIVÝ a nebezpečný pro životní prostředí. Škodlivý při požití. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Škodlivý: nebezpečí vážného poškození zdraví při delší expozici vdechováním a požití. Použijte vhodné ochranné oděvy.

Kyselina hematoxylinová je TOXICKÁ. Toxicity při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Nervy a játra.

Formaldehyd je TOXICKÝ. Toxicity při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Může způsobit přecitlivělost vdechutím a při kontaktu s pokožkou. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit dědičné genetické poškození. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte 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). Použijte pouze v dobře větraných prostorách.

Etanol je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oděvy.

30 % peroxid vodíku je OXIDAČNÍ a KOROZIVNÍ. Kontakt se zápalným materiálem může způsobit požár. Způsobuje popáleniny. Uchovávejte mimo dosah zápalného materiálu. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte 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).

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Reagencie indikátoru peroxidázy je TOXICKÁ a nebezpečná pro životní prostředí. Toxicity při vdechování, při styku s kůží a při požití. Dráždí oči a pokožku. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Velmi toxická pro vodní organismy, může způsobit dlouhodobé negativní dopady ve vodním prostředí. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Tento materiál a jeho nádoba se musí likvidovat jako nebezpečný odpad. Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

Kyselina hematoxylinová je ŠKODLIVÁ. Škodlivý při požití.

Formaldehyd je TOXICKÝ. Toxicity 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. Použijte 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). Použijte pouze v dobře větraných prostorách.

Etanol je VYSOCE HOŘLAVÝ. Vysoce hořlavý. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření.

Peroxid vodíku je KOROZIVNÍ. Způsobuje popáleniny. Po kontaktu s pokožkou ihned omýjte velkým množstvím vody. Použijte vhodné ochranné oděvy a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

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.

Pro zkoušku by se měly používat čerstvě připravené filmy celé krve nebo kostní dřeně. Krev se může shromažďovat v heparinu nebo EDTA. Vystavení světlu by se mělo minimalizovat protože leukocytární peroxidáza je nestálá na světle. Je uvedeno, že neustálené filmy jsou stabilní 3 týdny když se udržují ve tmě.¹ Před fixováním nechte filmy sušit 10 minut, chráněné před světlem.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Formaldehyd, 37 % roztok

Etanol, 95 % (v/v)

Fosfátem pufovaný fyziologický roztok, pH 7,4, katalogové č. P 3813

Peroxid vodíku, 30 %

POZNÁMKY:

Doporučuje se, aby krevní filmy připravené ze zdravých dárců byly zpracovány současně s patientskými vzorky pro kontrolu účinnosti systému.

I když myeloperoxidáza se obecně považuje za marker buněk myelocytického kmene, je nutné připustit, že monocytoidní buňky mohou také vykazovat slabou peroxidázni 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:

1. Fixovat filmy při pokojové teplotě po dobu 30 sekund ve **fixačním roztoku** .
2. Omývat sklička mírně tekoucí vodovodní vodou po dobu 2 minut a nechat schnout ve tmě po dobu 10 minut.
3. **Předehřát 50 ml TRIZMAL™ 6,3 zředěného pufru** v 37 °C vodní lázni.
4. Bezprostředně před použitím přidat 1 ampulku reagentie indikátoru peroxidázy , katalogové č. 390-1 a 200 µl (0,2 ml) 3 % peroxidu vodíku k předehřátému zředěnému pufru Trizmal™ 6,3. Řádně promíchat. Po použití vyhodit.
5. Umístit omýtá , fixovaná sklička (Krok 2) do roztoku reagentie indikátoru peroxidázy (Krok 4) na 30 minut ve tmě v 37°C vodní lázni.
6. Po inkubaci omývat sklička mírně tekoucí vodovodní vodou po dobu 15–30 sekund a nechat oschnout na vzduchu.
7. Zbarvit sklička kontrastním barvivem v roztoku kyseliny hematoxylinové, katalogové č. 285-2, po dobu 10 minut.
8. Oplachovat sklička v deionizované vodě po dobu 15–30 sekund. Nechat oschnout na vzduchu a mikroskopicky sklička vyhodnotit.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Krevní filmy připravené z normálních donorů byly obarveny na myeloperoxidázu podle tohoto postupu a benzidinovou metodou.¹ Neutrofilly prokázaly hnědočernou granulaci tímto postupem a modrou granulaci benzidinovým postupem. V obou případech se monocyty vybarvily méně intenzivněji a lymfocyty neprokázaly myeloperoxidázní aktivitu.

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

REFERENCE

1. Kaplow SL: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood 26:215, 1965.
2. Graham RC, Karnovsky MJ: The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14:291, 1966.
3. Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A: A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem 9:789, 1977.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Randrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. Brit J Haematol 33:451, 1976.
5. Marmont AM, Damasio E, Zucker-Franklin D: Neutrophils. In Atlas of Blood Cells-Function and Pathology, Vol. 1. Edited by D Zucker-Franklin, MF Greaves, CE Grossi, AM Marmont, Lea and Febrieger, Philadelphia, 1981, pp 149-424.

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. 390
Předchozí revize: 2003-03
Revidováno: 2003-09



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
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