



SIGMA-ALDRICH®

**NAFTOL AS-D CHLORACETÁT
ESTERÁZA A
α-NAFTYLACETÁT ESTERÁZA**
(Postup č. 90)

POUŽITÍ

Reagencie Sigma-Aldrich jsou určeny pro cytologický průkaz naftol AS-D chloracetát esterázy a α-naftyl acetát esterázy v krevních filmech, filmech kostní dřevě nebo otiskových tkáňových preparátech. Reagencie pro průkaz esterázy jsou určeny k "diagnostice in vitro."

Buněčné esterázy jsou všudypřítomné a zřejmě reprezentují sérii různých enzymů aktivovaných vybranými substráty. Na základě definovaných podmínek reakce lze určit typy hemopoitických buněk, podle použití specifických substrátů pro esterázy. Popsaná metoda poskytuje návod k rozlišení granulocytů od monocytů.¹⁻³

K provedení testu je třeba krevní filmy, filmy kostní dřevě nebo otiskové tkáňové preparáty inkubovat buď naftol AS-D chloracetátem nebo α-naftyl acetátem za přítomnosti stabilní diazoniové sole. Enzymatická hydrolyza esterové vazby uvolňuje volné naftolové sloučeniny. Ty se spojují s diazoniovou solí a vytvářejí silně klorované usazeniny v oblastech enzymatické aktivity.

REAGENCIE

DIMETHYL FORMAMID, katalogové č. 90-10

ETHYLEN GLYKOL MONOMETHYL ETHER, katalogové č. 90-11

NAFTOL AS-D CHLORACETÁT, katalogové č. 90-5
V kapslích o obsahu 20 mg.

α-NAFTYL ACETÁT, katalogové č. 90-6
V kapslích o obsahu 20 mg.

KONCENTROVANÝ PUFR TRIZMAL™ 6,3, katalogové č. 90-3C

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

KONCENTROVANÝ PUFR TRIZMAL™ 7,6, katalogové č. 90-2C

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

ROZTOK MAYERŮV HEMATOXYLIN, katalogové č. MHS-1
Hematoxylin, certifikovaný, 0,1 % (w/v) a stabilizátory.

ROZTOK KYSELÉHO HEMATOXYLINU, katalogové č. 285-2
Hematoxylin, certifikovaný, 1 g/l, pH 3,3 při 25 °C.

SŮL FAST BLUE (rychlá modř) RR, katalogové č. FBS-25
Předem navážené kapsle. Skutečná hmotnost na jednu kapsli kolísá v každé šarži barvíva a je optimalizovaná pro test.

SŮL FAST GARNET GB, katalogové č. 90-15
Obsah barvíva je uveden na štítku reagentu.

CITRÁTOVÝ KONCENTRÁT, katalogové č. 386-1
Citrátový pufr, 0,383 mol/l, pH 5,4, pokud je zředěn podle postupu.

GLYCEROLOVÁ ŽELATINA, katalogové č. GG-1
Směs glycerolu a želatiny s obsahem fenolu, 1 %.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Dimethyl formamid, ethylen glykol monomethyl ether, koncentrovaný pufr TRIZMAL™ 6,3, koncentrovaný pufr TRIZMAL™ 7,6, roztok Mayerův hematoxylin a roztok kyselého hematoxylinu se uchovávají při pokojové teplotě (18-26 °C).

Naftol AS-D chloracetát, α-naftyl acetát a sůl Fast Blue RR se skladují při teplotě nižší než 0 °C.

Sůl Fast Corinth V a citrátový koncentrát se uchovávají v lednici (2-8 °C).

Naftol AS-D chloracetát, α-naftyl acetát, sůl Fast Blue RR a sůl Fast Corinth V jsou stabilní až do data expirace uvedeného na štítku.

Zředěný roztok citrátu je stabilní po dobu 1 týdne, když se uchovává pevně uzavřený při pokojové teplotě (18-26 °C).

Koncentrovaný pufr TRIZMAL™ 6,3, koncentrovaný pufr TRIZMAL™ 7,6 a citrátový koncentrát lze používat, pokud není viditelně mikrobiálně znečištěn.

Fluorid sodný, 2 g/dl. Skladujte reagenty při pokojové teplotě (18-26 °C). Používá se, pokud je prováděn postup "α-Naftyl acetát esteráza s inhibicí fluoridem".

Glycerolová želatina, katalogové č. GG-1. Uchovávejte v lednici (2-8 °C).

ZHORŠENÍ:

Dimethyl formamid a ethylene glykol monomethyl ether zlikvidujte, jakmile se zabarví nebo zakalí.

Zředěný pufrový roztok TRIZMAL™ 6,3 a zředěný pufrový roztok TRIZMAL™ 7,6 je možné použít pouze jednou, potom zlikvidovat.

Roztok Mayerův hematoxylin a roztok kyselého hematoxylinu je třeba zlikvidovat, když doba požadovaná pro vhodné zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 5 minut.

PŘÍPRAVA:

ROZTOK NAFTOL AS-D CHLORACETÁT se připravuje rozpuštěním obsahu 1 kapsle naftol AS-D chloracetátu ve 2 mL dimethyl formamidu, katalogové č. 90-10. Když potřebujete, vyjměte 1 kapsli z mrazničky. Připravte těsně před použitím.

α-ROZTOK NAFTYL ACETÁT se připravuje rozpuštěním obsahu 1 kapsle α-naftyl acetátu ve 2 mL ethylene glykol monomethyl etheru, katalogové č. 90-11. Když potřebujete, vyjměte 1 kapsli z mrazničky. Připravte těsně před použitím.

ZŘEDĚNÝ PUFROVÝ ROZTOK TRIZMAL™ 6,3 se připravuje zředěním 1 dílu koncentrovaného pufru TRIZMAL™ 6,3 s 9 díly deionizované vody. Faktor pH musí být 6,3 při 25 °C.

ZŘEDĚNÝ PUFROVÝ ROZTOK TRIZMAL™ 7,6 se připravuje zředěním 1 dílu koncentrovaného pufru TRIZMAL™ 7,6 s 9 díly deionizované vody. Faktor pH musí být 7,6 při 25 °C.

Mayerův hematoxylin a kyselý roztok hematoxylinu je třeba před použitím přefiltrovat.

ZŘEDĚNÝ CITRÁTOVÝ ROZTOK se připravuje zředěním 1 dílu koncentrovaného citrátu, katalogové č. 386-1, s 9 díly deionizované vody. Při ředění je pH 5,4.

CITRÁT-ACETON-METHANOLOVÉ FIXATIVUM: K 18 mL zředěného citrátového roztoku přidejte 27 mL aceton, stupeň ACS a 5 mL methanolu, katalogové č. M 1775. Skladujte pevně uzavřené při pokojové teplotě (18-26 °C). Zlikvidujte po 8 hodinách.

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

Dimethyl formamid je TOXICKÝ. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči a pokožku. Může poškodit nenarozené dítě. Nevdechujte výpary. 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). Vznětlivý - Lehce absorbovatelný kůží. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Ethylen glykol monomethyl ether je VZNĚTLIVÝ A TOXICKÝ. Škodlivý při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Negativně působí na plodnost. Může poškodit nenarozené dítě. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny. Zasažené orgány: Krev a ledviny.

Naftol AS-D chloracetát a α-naftyl acetát. Upozornění: Zamezte kontaktu a vdechnutí.

Koncentrovaný pufr TRIZMAL™ 7,6 a koncentrovaný pufr TRIZMAL™ 6,3 jsou ŠKODLIVÉ. Škodlivý při požití. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Škodlivý: nebezpečí vážného poškození zdraví při delší expozici vdechováním a požití. Používejte vhodné ochranné oděvy. Možný karcinogen. Calif. Prop. 65 karcinogen.

Mayerův hematoxylinový roztok je TOXICKÝ. Toxický 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 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.

Kyselý roztok hematoxylinu je TOXICKÝ. Toxický 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 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.

Sůl Fast Blue RR. Zamezte kontaktu a vdechnutí.

Sůl Fast Corinth V je TOXICKÁ. Škodlivý při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Může způsobit rakovinu. Může způsobit dědičné genetické poškození. Nevdechujte prach. 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).

Koncentrát citrátu je ŽÍRAVÝ. 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 ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Methanol je HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. Přijměte příslušná bezpečnostní opatření proti výbojům statické elektriny. Zamezte kontaktu s kůží. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

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. 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.

2 % roztok fluoridu sodného. Upozornění: Zamezte kontaktu a vdechnutí. Zasažené orgány: Ledviny a kosti.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Dimethyl formamid je TOXICKÝ. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči. Může poškodit nenarozené dítě. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Pouze pro profesionální uživatele. Pozor - zamezte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Ethylen glykol monomethyl ether je TOXICKÝ. Hořlavý. Škodlivý při vdechnutí, v kontaktu s kůží a při požití. Negativně působí na plodnost. Může poškodit nenarozené dítě. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Naftol AS-D chloracetát a α-naftyl acetát. Nevdechujte prach. Zamezte kontaktu s kůží a očima.

Mayerův hematoxylinový roztok je ŠKODLIVÝ. Škodlivý při požití.

Kyselý roztok hematoxylinu je ŠKODLIVÝ. Škodlivý při požití.

Sůl Fast Blue RR. Nevdechujte prach. Zamezte kontaktu s kůží a očima.

Sůl Fast Corinth V je TOXICKÁ. Škodlivý při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Může způsobit rakovinu. Může způsobit dědičné genetické poškození.

Nevdechujte prach. 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). Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Koncentrát 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.

Methanol je VYSOCE HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Vysoce hořlavý. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

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. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

2 % roztok fluoridu sodného. Zamezte kontaktu s kůží a očima.

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 přenašet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Krevní filmy, filmy kostní dřevě, otiskové tkáňové preparáty a cytocentrifugované preparáty lze použít jak pro α-naftyl acetát esterázu, tak pro naftol AS-D chloracetát esterázu. Jako antikoagulant lze použít EDTA nebo heparin.⁹ Zmrazené a parafinové tkáňové řezy je možné použít s naftol AS-D chloracetát esterázou. α-Naftyl acetát esterázu lze úspěšně použít na zmrazených tkáňových řezech.¹⁰ Krevní filmy a filmy kostní dřevě lze skladovat fixované při pokojové teplotě (18-26 °C) po dobu několika týdnů nebo nefixované několik dnů, aniž by se změnila účinnost.^{5,9} Neposílejte plnou krev na testování do jiných laboratoří. Posílejte ustálená nebo neustálená sklička.

Během přepravy by se sklíčka měla udržovat v chladu. Nechte filmy schnout asi hodinu před fixací.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Methanol, absolutní
Aceton, ACS reagentie
ROZTOK FLUORIDU SODNÉHO, katalogové č. 91-9
Fluorid sodný, 2 g/dl

POZNÁMKY:

Zde popisovaný postup se provádí při 37 °C. Pokud reagentie nejsou zpracovávány při pokojové teplotě, mohou reakce vést ke slabému nebo negativnímu zabarvení. Doporučuje se kontrolovat teplotu správným teploměrem. Vodní lázeň s řízenou teplotou je mnohem účinnější než teplotovzdušné inkubátory a je doporučována pro cytochemické enzymatické metody. Přenos tepla je rychlejší přes sklo než přes umělou hmotu, z tohoto důvodu se doporučuje použít skleněné nádoby Coplin.

Většina enzymatických systémů je citlivá na stopy detergentu. Umyjte skleněné nádoby roztokem odbarvovače a vypláchněte dostatečným množstvím deionizované vody, tak zamezíte působení detergentu na buněčné enzymy.

Výsledky jsou závislé do určité míry na subjektivní interpretaci. Jednotlivé laboratoře musí stanovit vlastní běžný rozsah.

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: POSTUP NAFTOL AS-D CHLORACETÁT ESTERÁZY:

1. Fixujte sklíčka na 1 minutu ve fixačním roztoku citrát-aceton-methanol při pokojové teplotě (18–26 °C).
2. Důkladně promyjte v deionizované vodě a nechejte uschnout na vzduchu po dobu alespoň 20 minut.
3. Do 50 mL zředěného pufovaného roztoku TRIZMAL™ 6,3, PŘEDEM ZAHŘÁTÉHO NA 37 °C, přidejte za stálého míchání obsah 1 kapsle soli Fast Corinth V, katalogové č. 90-15.
4. Když je sůl zcela rozpuštěna, přidejte 2 mL roztoku naftol ASD chloracetát. Roztok je trochu zakalený.
5. Pokračujte v míchání dalších 15–30 sekund, potom vložte do nádoby Coplin. NEFILTRUJTE.
6. Umístěte vzorky do barvičho roztoku (z kroku 5) a inkubujte při 37 °C na 5 minut.

POZNÁMKA: CHRÁŇTE PŘED SVĚTLEM.

7. Vyjměte sklíčka a promývejte 3 minuty deionizovanou vodou. Barvičí roztok zlikvidujte.
8. Je-li to potřeba, proveďte kontrastní barvení v kyselém roztoku hematoxylinu, katalogové č. 285-2, na 5–10 minut a propláchněte ve vodovodní vodě.
9. Nechejte oschnout na vzduchu a mikroskopicky sklíčka vyhodnoťte. Je-li potřeba sklíčka zakrýt, použijte pouze vodné montážní médium.

POSTUP α-NAFTYL ACETÁT ESTERÁZA

1. Fixujte sklíčka na 1 minutu ve fixačním roztoku citrát-aceton-methanol při pokojové teplotě (18–26 °C).
2. Důkladně promyjte v deionizované vodě a nechejte uschnout na vzduchu po dobu alespoň 20 minut.
3. Do 50 mL zředěného pufovaného roztoku TRIZMAL™ 7,6, PŘEDEM ZAHŘÁTÉHO NA 37 °C, přidejte za stálého míchání obsah 1 kapsle soli Blue RR, katalogové č. FBS-25.
4. Když je sůl zcela rozpuštěna, přidejte 2 mL roztoku naftyl acetát. Roztok bude nažloutlý a lehce zakalený.
5. Pokračujte v míchání dalších 15–20 sekund, potom vložte do nádoby Coplin. NEFILTRUJTE.
6. Umístěte vzorky do barvičho roztoku (z kroku 5) a inkubujte při 37 °C na 30 minut.

POZNÁMKA: CHRÁŇTE PŘED SVĚTLEM.

7. Vyjměte sklíčka a promývejte 3 minuty deionizovanou vodou. Barvičí roztok zlikvidujte.
8. Je-li to potřeba, proveďte kontrastní barvení na 5–10 minut v roztoku Mayerova hematoxylinu, katalogové č. MHS-1 a propláchněte ve vodovodní vodě.
9. Nechejte oschnout na vzduchu a mikroskopicky sklíčka vyhodnoťte. Je-li potřeba sklíčka zakrýt, použijte pouze vodné montážní médium.

POSTUP DVOJÍHO BARVENÍ ESTERÁZY

1. Proveďte test α-naftyl acetát esterázy, jak je popsáno v návodu k postupu. Neprovádějte kontrastní barvení.
2. Opláchněte sklíčka v deionizované vodě na 5 minut.
3. Proveďte test naftol AS-D chloracetát esterázy podle popsání postupu, kroky 3–9.

POSTUP α-NAFTYL ACETÁT ESTERÁZA S INHIBICÍ FLUORIDEM

Ačkoliv α-naftyl acetát esteráza se nachází zejména v buňkách monocytických linií, pokud je postup proveden podle tohoto návodu, mělo by se prokázat, že megakaryocyty a erytrocyty jsou na tento enzym pozitivní.¹¹ Lymfocyty a některé zralé granulocyty vykazují někdy též pozitivitu.⁹ Aby bylo možné tyto buňky přesvědčivě odlišit od monocytů, je do inkubačního

systému zapojen fluorid sodný. Enzym monocytů je přítomností této sloučeniny inaktivován.¹² Následující postup je určen k provedení inhibičního testu fluoridu.

1. Fixujte sklíčka na 1 minutu ve fixačním roztoku citrát-aceton-methanol při pokojové teplotě (18–26 °C).
2. Důkladně promyjte v deionizované vodě a nechejte uschnout na vzduchu po dobu alespoň 20 minut.
3. Opatřete štítkem A a B 2 kádinky a přidejte následující:

	Kádinka A	Kádinka B
Předem na 37 °C zahřátý zředěný pufr TRIZMAL™ 7,6	50 mL	50 mL
Za stálého míchání přidejte Fast Blue RR	1 kapsli	1 kapsli
α-NAFTYL ACETÁT ESTERÁZY	2 mL	2 mL
roztoku fluoridu sodného	—	2 mL

4. Dobře promíchejte a nalijte do nádob Coplin označených A a B.
5. Pokračujte podle kroků 6–9 popsání postupu α-naftyl acetát esterázy.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

BODOVACÍ METODA:

Prohlédněte film a vyberte tenkou oblast s několika erytrocyty. Oblasti s aktivitou naftol AS-D chloracetát esterázy se zobrazí jako světle červené zrnění, α-naftyl acetát esteráza jako černé zrnění. Vyhodnoťte stupnici od 0 do 4 + na základě množství a intenzity konkrétního vyváženého barviva uvnitř cytoplazmy těchto typů buněk. Charakteristiky bodování jsou závislé na subjektivní interpretaci. Navrhované uspořádání bodování je uvedeno v tabulce 1. Závěry jsou průměrovány na relativní přítomnost nebo nepřítomnost zabarvení.

TABULKA I Charakteristiky bodování		
Hodnocení buněk	Intenzita zabarvení	Interpretace
0	Žádné	–
1+	Nejasné až střední	±
2+	Střední až silné	+
3+	Silné	++
4+	Velmi silné	+++

VÝSLEDKY:

NAFTOL AS-D CHLORACETÁT ESTERÁZA

Tento enzym je obvykle považován jako specifický pro buňky granulocytických linií. Buňky by měly zobrazovat červené zrnění. Slabá aktivita nebo její nepřítomnost je v monocytech a lymfocytech.

α-NAFTYL ACETÁT ESTERÁZA

V podmínkách testu (pH 7,6) je tento enzym detekován zejména v monocytech, makrofázích a histiocytech a je nepřítomen téměř ve všech granulocytech. Monocyty musí vykazovat černé zrnění. Lymfocyty mohou aktivitu vykazovat občasně.

α-NAFTYL ACETÁT ESTERÁZA S INHIBICÍ FLUORIDEM

Všechny monocytické linie jsou na enzymatickou aktivitu negativní, s výjimkou rozlišených histiocyty nebo specializovaných makrofágů v tkáni, která může být na fluorid sodný rezistentní.¹⁰

DVOJÍ BARVENÍ ESTERÁZY

Vzorky, na kterých byla provedena procedura dvojitého barvení, vykazují granulocyty s červeným zrněním a monocyty s černým zrněním.

Očekávaná buněčná reaktivita testů pro esterázovou aktivitu je shrnuta v tabulce II.

TABULKA II Cytochemické reakce krevních buněk		
Typ buněk	Naftol AS-D chloracetát esteráza	α-Naftyl acetát esteráza
Myeloblasty	±	±
Promyelocyt	+	±
Neutrofil	+	—
Eosinofil	—	—
Bazofil	±	—
Monocyt	—	+
Lymfocyt	—	±
Lymfoblast	—	±
Megakaryocyt	—	+
Erytroblast	—	±
Plazmatické buňky	—	±
Mastocyty	+	—
Vlasaté buňky	—	±
Histiocyt	±	+

Reagenční systém je třeba monitorovat použitím pozitivních a negativních kontrolních sklíček. Pozitivní kontrolní sklíčka lze připravit z leukemických vzorků nebo buněčných linií, které jsou prokázány jako pozitivní. Buněčné linie lze získat z Amerického registru kultur (ATCC), kultivované, zmrazené a uchovávané v tekutém nitrogu. Vhodné jako pozitivní kontroly jsou: A-937, derivovaná z lidského cytoticketického lymfomu, pro nespecifickou esterázu; promyelocytická linie HL-60, pro naftol AS-D chloracetát esterázu; a Molt-4, derivovaná z T-buněčné leukémie, pro α-naftol acetát esterázu.

Další buněčné linie pro správné provedení procedur naleznete v literatuře. Dále lze použít antikoagulovanou krev z normálních vzorků (přednostně se zvýšeným počtem monocytů, když se jedná o postup α-naftyl acetát esterázy); avšak tyto linie budou vykazovat slabší intenzitu zabarvení a budou mít menší počet pozitivních buněk.

Známa negativní sklíčka pacientů lze použít jako negativní kontrolu. Nejsou-li k dispozici, lze, k docílení požadovaných výsledků, vzorky barvit v inkubační směsi s vynecháním substrátu. Doporučuje se však použít výše uvedené.



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

REFERENCE

1. Beard, MEJ, Fairly GH: Acute leukemia in adults. Semin Hematol 11:5, 1974
2. Beckmann H, Neth R, Gaedicke G, Lanbeck G, Schoch G, Wiegiers U, Winkler K: 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 HJ, 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, Sleggerman L: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. J Histochem Cytochem 8:200, 1960
9. Brown BA: IN Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1984, pp 127-130
10. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, IL, 1985, pp 24, 38
11. Hayhoe FGJ, Flemans RJ: IN Color Atlas of Hematological Cytology. John Wiley & Sons, New York, NY, 1982, pp 34, 111
12. Li CY, Lam KW, Lam LT: Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem 21:1, 1973

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. 90
Předchozí revize: 2003-09
Revidováno: 2006-04

  AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Eggesüdt Királysg

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