

α -NAPHTHYL BUTYRATE ESTERASE LEUKOCYTE

Colorazione citochimica su strisci di sangue o di midollo per la tipizzazione di forme leucemiche

10 x 4 test

REF 3091

PREMESSA

Il kit è stato realizzato in modo da diminuire i volumi dei reagenti e il contatto tra il laboratorista ed i reagenti tossici, di facilitarne lo smaltimento e di semplificare l'esecuzione del test.

Per il kit sono stati impiegati quei reagenti che in base alle attuali conoscenze risultano essere i meno tossici ed inquinanti.

PRINCIPIO DELLA REAZIONE

Gli strisci di sangue o di midollo sono incubati con α -naftil butirato e pararosanilina. L'eventuale presenza di butirato esterasi è messa in evidenza nelle cellule della linea monocitico-macrofagica dalla formazione nel citoplasma di un complesso insolubile di colore marrone-rossastro.

La presenza del complesso colorato nelle cellule è valutata al microscopio ottico.

Il kit viene impiegato per la tipizzazione di forme leucemiche.

REAGENTI E MATERIALI

Contenuto del kit:

* **REAGENT 1** Sodio nitrito (liofilo)

REF 3091
10 flaconi

TOSSICITÀ: Sostanza tossica per ingestione

* **REAGENT 2** Pararosanilina $\geq 2,0$ g/L

1 x 10 mL

TOSSICITÀ Sostanza tossica per contatto e ingestione.

Conservare al riparo dalla luce.

REAGENT 3 Tampone 74 mmol/L

1 x 45 mL

* **REAGENT 4** α -Naftil butirato (sospensione)

1 x 5 mL

AVVERTENZA: Agitare bene prima dell'uso.

PIASTRE multi-vaschette (4 vaschette per piastra)

10

COPERCHIO nero per le piastre

1

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le Schede di sicurezza.

STABILITÀ: a 2-8°C e ben chiusi si conservano inalterati fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

REAGENTI NECESSARI NON FORNITI

FISSATIVO:

preparazione della soluzione formaldeide 37% 1 volume

di fissaggio dello striscio: etanolo assoluto 9 volumi

CONTROCOLORAZIONE: Blu di metilene o soluzione Giemsa.

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Microscopio ottico 400x o 1000x per la lettura dei vetrini.

Pipette con puntale monouso o pipette Pasteur per il prelievo e la distribuzione dei reagenti.

Timer.

Acqua deionizzata.

CAMPIONE

Strisci di sangue (preferibilmente capillare) o di midollo.

I campioni di sangue possono essere raccolti con EDTA o eparina.

Gli strisci di sangue o di midollo possono essere conservati a temperatura ambiente (18-26°C), protetti dalla polvere, per alcuni giorni senza che si verifichino apprezzabili cambiamenti di attività.

I vetrini fissati si conservano per molte settimane.

PROCEDIMENTO

A) FISSAGGIO DEI VETRINI (vedi osservazioni)

1. Fissare gli strisci seccati all'aria mettendoli a contatto per 1 minuto con il fissativo.

2. Lavare entrambi i lati del vetrino con abbondante acqua deionizzata, scolarlo ed attendere che sia asciutto. Il fissativo consigliato contiene formaldeide. Anche una piccola quantità di formaldeide presente sui vetrini può provocare l'inibizione dell'enzima.

B) PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima di utilizzarli.

Svitare il tappo a vite e togliere delicatamente il tappo in gomma ad un flacone di Reagent 1.

1. Prelevare 1 mL di Reagent 2 ed aggiungerlo al flacone di Reagent 1. Rimettere il tappo ed agitare delicatamente per inversione fino a solubilizzazione del liofilo. Attendere 2 minuti.

2. Riaprire il flacone di Reagent 1 e aggiungere 4 mL di Reagente 3.

3. Il Reagent 4 contiene una sospensione: **agitare bene** il flacone prima di prelevarne 0,5 mL ed aggiungerlo al Reagent 1.

Rimettere il tappo ed agitare bene per inversione.

STABILITÀ: la soluzione di lavoro va utilizzata subito dopo la preparazione.

C) REAZIONE DELLA α -NAFTIL BUTIRRATO ESTERASI

1. Disporre su un piano le piastre multi-vaschette necessarie.

Ciascuna piastra e ciascun flacone di soluzione di lavoro consentono di eseguire 4 determinazioni.

2. Appoggiare sulla piastra i vetrini con lo striscio rivolto verso il basso, cioè verso il fondo della vaschetta altrimenti la soluzione di lavoro non andrà a contatto con lo striscio.

3. Spingere il vetrino contro uno dei due bordi lunghi della vaschetta.

Tra l'altro lato maggiore del vetrino e quello della vaschetta si avrà una lunga fessura nella quale si inietterà la soluzione di lavoro.

4. Prelevare 1 mL di soluzione di lavoro con una pipetta o con una Pasteur. Inserire la punta del puntale o della Pasteur nella zona centrale della fessura e iniettarvi lentamente la soluzione di lavoro.

La soluzione si distribuirà nella vaschetta entrando a contatto con lo striscio. Meno di 1 mL è sufficiente per riempire la vaschetta. Procedere allo stesso modo con gli altri vetrini.

5. Coprire la piastra con il coperchio per ripararla dalla luce.

Se si utilizzano più piastre, disporle una sull'altra prima di coprirle con il coperchio. Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (18-26°C).

6. Prelevare i vetrini con una pinzetta o con le dita (indossando guanti monouso) e sciacquarli con acqua corrente.

Per facilitare il prelievo premere leggermente un'estremità del vetrino in modo che si sollevi l'altra estremità.

Le piastre lavate ed asciugate possono essere utilizzate per la conservazione dei vetrini.

D) CONTROCOLORAZIONE (vedi osservazioni)

1. Controcolorare con Blu di metilene per 5 minuti o con Giemsa per 10 minuti.

2. Sciacquare con acqua corrente, asciugare e leggere al microscopio.

RISULTATI

L'attività enzimatica si manifesta con la presenza di una colorazione marrone-rossastra.

Se si utilizza il Blu di metilene la colorazione dovuta alla reazione enzimatica che indica la presenza di α -naftil butirato esterasi risulta più evidente di quando si usa la soluzione Giemsa.

Se si usa la soluzione Giemsa si ha una buona definizione delle cellule ma la colorazione dovuta alla reazione enzimatica può risultare meno evidente in quanto attenuata dalla colorazione delle cellule dovuta alla soluzione stessa.

PATOLOGIA

La reazione è utile per l'identificazione di cellule della linea monocito-macrofagica, poiché esse assumono una colorazione diffusa rosso-marrone. La reazione è particolarmente utile nel differenziamento della leucemia mielomonocitica acuta (in cui i monociti ed i blasti presentano una reazione esterasica positiva) dalla leucemia granulocitica acuta (in cui i blasti e i promielociti presentano negatività alla reazione). In alcuni casi di mielodisplasia e di leucemia mielomonocitica è possibile ritrovare una positività dell'enzima in alcune cellule della linea mieloide.

OSSERVAZIONI

Le piastre possono essere utilizzate anche per il fissaggio e la controcolorazione. In questo caso disporre i vetrini come descritto nel paragrafo C) ed iniettare nella fessura la soluzione di fissaggio o il colorante invece della soluzione di lavoro. Per i tempi di fissaggio, di controcolorazione e i relativi lavaggio seguire i procedimenti descritti ai paragrafi A) e D).








SMALTIMENTO RIFIUTI

Smaltire i liquidi e i materiali usati secondo le normative del paese.

BIBLIOGRAFIA

Disponibile su richiesta.

LEGENDA SIMBOLI

	dispositivo medico diagnostico in vitro
	numero di lotto
	numero di catalogo
	limite di temperatura
	usare entro la data
	attenzione
	consultare le istruzioni per l'uso

IVD

CE

Ed. 03 - 12.2023 RR

PRODUTTORE

 FAR

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

tel +39 045 6700870 - sito web <http://www.fardiac.com>

e-mail: order@fardiac.com - e-mail: fardiac@fardiac.com