

NAPHTOL AS-D CHLOROACETATE ESTERASE LEUKOCYTE

Colorazione citochimica su strisci di sangue o di midollo per la differenziazione delle leucemie granulocitiche da quelle monocitiche

10 x 4 test

REF 3092

PREMESSA

Il kit è stato realizzato in modo da diminuire i volumi dei reagenti e il contatto tra il laboratorista ed i reagenti tossici, facilitarne lo smaltimento e 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 naftol AS-D cloroacetato e pararosanilina.

In presenza del naftol AS-D cloroacetato esterasi nel citoplasma delle cellule si forma un precipitato di colore rosso.

La reazione è positiva soltanto nelle cellule della linea granulocitaria dal mieloblasto al granulocita maturo. È debole o assente nei monociti e nei linfociti. La presenza del precipitato colorato è valutata al microscopio.

Il kit viene impiegato per riconoscere le cellule di origine granulocitica e quindi per differenziare le leucemie granulocitiche da quelle monocitiche.

REAGENTI E MATERIALI

Contenuto del kit:	REF 3092
* REAGENT 1 Sodio nitrito (liofilo)	10 flaconi
TOSSICITÀ: Sostanza tossica per ingestione	
* REAGENT 2 Pararosanilina	1 x 10 mL
TOSSICITÀ: Sostanza tossica per contatto e ingestione.	
Conservare al riparo dalla luce.	
* REAGENT 3 Tampone	1 x 45 mL
* REAGENT 4 Naftol AS-D cloroacetato	1 x 2 mL
TOSSICITÀ: sostanza nociva per inalazione.	
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 sull'etichetta.

REAGENTI NECESSARI E NON FORNITI

FISSATIVO:		
preparazione della soluzione	formaldeide 37%	1 volume
di fissaggio dello striscio:	etanolo assoluto	9 volumi

CONTROCOLORAZIONE: soluzione Giemsa.

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

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

Termostato a 37°C, utile per ridurre i tempi di incubazione del test.

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 il vetrino su entrambi i lati 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.

È quindi necessario rimuovere completamente il fissativo.

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. Aggiungere 1 mL di Reagent 2 al flacone di Reagent 1.

Rimettere il tappo in gomma ed agitare per inversione fino alla completa solubilizzazione del liofilo. Attendere 2 minuti.

2. Riaprire il flacone ed aggiungere 4 mL di Reagent 3. Chiudere ed agitare bene.

3. Riaprire il flacone ed aggiungere 0,1 mL di Reagent 4. Chiudere ed agitare bene.

STABILITÀ: utilizzare la soluzione di lavoro subito dopo la preparazione.

C) REAZIONE DELLA AS-D CLOROACETATO 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. Lo striscio deve essere rivolto verso il basso e 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. Porre la piastra in termostato a 37°C e coprirlo con il coperchio per ripararla dalla luce. Se si utilizzano più piastre, disporre una sull'altra prima di coprirle con il coperchio. Incubare per 15 minuti. In alternativa, non disponendo di un termostato, incubare per 20 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 Giemsa per 10 minuti.

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

L'esperienza nelle tecniche di citochimica consente la valutazione dei vetrini senza controcolorazione.

RISULTATI

L'attività enzimatica si manifesta con la presenza di granuli color rosso nel citoplasma cellulare.

PATOLOGIA

La reazione viene utilizzata nella classificazione delle leucemie acute e croniche 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 lavaggi 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.fardiq.com>
e-mail: order@fardiq.com - e-mail: fardiq@fardiq.com