

Instructions for Use

Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit

Procedure No. 86



Intended Use

Sigma-Aldrich Alkaline Phosphatase kits are intended as a general laboratory use histological stain. Alkaline Phosphatase reagents are for professional "In Vitro Diagnostic Use" only. This manual, qualitative, histochemical procedure demonstrates alkaline phosphatase activity in leukocytes of human blood or bone marrow films. Histological visualization of leukocyte associated alkaline phosphatase is a unique technique currently commonly used in medicine.

In hematopoietic tissue, alkaline phosphatase appears restricted to band and segmented neutrophils.^{1,2} Its demonstration by simultaneous capture using substituted naphthols and diazonium salts is, perhaps, the earliest example of a cytochemical enzyme test with clinical significance.³

Most procedures, including those provided by Sigma-Aldrich, employ stable diazonium salts. These are formed by reacting an arylamine with sodium nitrite in an acid medium.⁴ The resulting diazonium chloride (usually unstable) can then be treated with compounds such as zinc chloride, zinc sulfate or naphthalene-1,6-disulfonate, forming stable salts. These stabilizers may exert marked inhibition on some enzymatic systems whereas the diazonium chlorides are less inhibitory.⁴ For this reason, Sigma-Aldrich now provides stable solutions of fast red violet LB base, fast blue BB base, and sodium nitrite for alkaline phosphatase cytochemistry. To further simplify these methods, a stable solution of naphthol AS-BI phosphate is included.

To perform the test, fixed blood films are incubated at room temperature (18–26°C) in a solution containing naphthol AS-BI phosphate and freshly prepared fast red violet LB salt or fast blue BB salt buffered at pH 9.5 with 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol AMPD). Sites of activity are either red or blue depending upon choice of diazonium salt. The procedure incorporating fast red violet LB is similar to a proposed NCCLS reference method.⁵

Reagents

Naphthol AS-BI Alkaline Solution (Cat. No. 861-10ML)

Naphthol AS-BI phosphate, 4 mg/mL, in AMPD buffer, 2 mol/L, pH 9.5. Warning. Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. May cause respiratory irritation. Avoid breathing vapors.

FRV-Alkaline Solution (Cat. No. 862-10ML)

Fast red violet LB base, 5 mg/mL, in hydrochloric acid, 0.4 mol/L, with stabilizer. Warning. Harmful if swallowed.

FBB-Alkaline Solution (Cat. No. 863-10ML)

Fast blue BB base, 5 mg/mL, C.I. 37175, in hydrochloric acid, 0.4 mol/L, with stabilizer

Sodium Nitrite Solution (Cat. No. 914-10ML)

Sodium nitrite, 0.1 mol/L

Citrate Solution (Cat. No. 915-50ML)

Citric acid, 18 mmol/L, sodium citrate, 9 mmol/L, sodium chloride, 12 mmol/L with surfactant, buffered at pH 3.6

Hematoxylin Solution, Gill No. 3 (Cat. No. GHS3-50ML)

Hematoxylin, certified, 6.0 g/L, C.I. 75290, sodium iodate, 0.6 g/L, and aluminum sulfate, 52.8 g/L, with stabilizers. Danger. Harmful if swallowed. Causes serious eye damage. Wear protective gloves/ eye protection/face protection.

Neutral Red Solution, Buffered (Cat. No. N6264-50ML)

Neutral red, certified, 0.5% w/v, C.I. 50040, in acetate buffer, pH 5.2. Preservative added.

Special Materials Required but Not Provided

- Acetone, ACS Reagent
- Formaldehyde, 37% ACS

Storage and Stability

Store Naphthol AS-BI Alkaline Solution, FRV-Alkaline Solution, FBB-Alkaline Solution and Sodium Nitrite Solution in refrigerator (2–8°C). Reagents are stable until expiration date. Store Citrate Solution in refrigerator (2–8°C). Solution is suitable for use in the absence of microbial growth.

Store Hematoxylin Solution and Neutral Red Solution at room temperature (18–26°C). Protect Hematoxylin Solution from light. Reagents are stable until expiration date.

Deterioration

Discard Hematoxylin Solution if solution turns brown (over-oxidized from air) or purple (loss of acidity).

Preparation

Reagents are provided ready for use.

Citrate-Acetone-Formaldehyde Fixative: To 25 mL Citrate Solution, Cat. No. 915-50ML, add 65 mL Acetone and 8 mL of 37% Formaldehyde. Place in glass bottle and cap tightly. Store in refrigerator (2–8°C). Warm to 18–26°C prior to use. Stable up to 4 weeks if stored tightly capped in refrigerator.

Precautions

These IVDs are intended for in vitro diagnostic use in a clinical laboratory environment. These IVDs are for professional use by qualified personnel only. Sigma-Aldrich IVDs may be operated

by laboratory personnel who are trained to handle human specimens that can be infectious, use microscopes and other laboratory equipment and have color perception and visual acuity to distinguish colors and other objects under a microscope.

Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. Dispose of waste observing all local, state, provincial or national regulations.

Procedure

Specimen Collection

No known test method can offer complete assurance that blood samples or tissue will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives or tissue specimens should be considered potentially infectious.

Fresh blood or bone marrow films or samples anticoagulated with heparin may be used.⁵ AVOID EDTA.⁵ Blood smears should be stained for enzyme activity within 8 hours after preparation. However, if this is not possible, gradual loss of alkaline phosphatase activity may be delayed by fixation and storage overnight in freezer.⁵ Films should be dried at least 1 hour prior to fixation and 3 hours post-fixation before freezing.

Notes

Perform procedure using positive controls. These can be obtained from patients with pyogenic leukocytosis, or women in the third trimester of pregnancy or during the first several days postpartum. Leukocyte alkaline phosphatase scores from these persons usually exceed 100. A negative control can be prepared from a normal fixed smear by immersing it in boiling water for 1 minute to inactivate the enzyme. Control films can be preserved up to 1 year if stored fixed, wrapped in Parafilm® at –70°C. These films should be dried at least 1 hour prior to fixation and 3 hours post-fixation before freezing.

It is strongly recommended that each laboratory establish its own expected range, characteristic for the local population.

The procedure depends upon subjective rating of stained cells. This can result in a wide variation of ratings obtained. The temperature of the reaction mixture must be kept between 18–26°C. Lower temperatures will result in significantly lower scores. Above 30°C, marked increases in activity will occur. Eosinophils do not stain but can be recognized by bilobed nuclei and large refractile granules.

There is a scarcity of data concerning compounds which may interfere with leukocyte alkaline phosphatase activity (LAPA). Certain drugs and other substances are known to influence circulating alkaline phosphatase activity.⁶ Oral contraceptives, cortisol and stress may result in elevated leukocyte alkaline phosphatase scores.³

In humans, alkaline phosphatase activity is restricted to mature and band-form granulocytes. Occasionally weak staining may be observed in lymphocytes. Bone marrow osteoblasts and endothelial cells stain strongly.

Procedure

NOTE: For use with Columbia jars, divide reagent volumes by 5.

1. Measure 45 mL deionized water and adjust temperature to 18–26°C.
2. Prepare diazonium salt solution:
Add 1 mL Sodium Nitrite Solution, to 1 mL of FRV-Alkaline Solution OR
Add 1 mL Sodium Nitrite Solution, to 1 mL of FBB-Alkaline Solution. Mix by gentle inversion. Allow to stand for 2 minutes.
3. Add solution prepared in Step 2 to the deionized water from Step 1.
4. Add 1 mL Naphthol AS-BI Alkaline Solution, to diluted diazonium salt solution (Step 3). Mix thoroughly and pour into a Coplin jar.
5. Bring Citrate-Acetone-Formaldehyde Fixative to room temperature (18–26°C). Fix slides by immersing in fixative solution for 30 seconds. Rinse gently in deionized water for 45 seconds. Do not allow slides to dry.
6. Add slides to alkaline-dye mixture (Step 4) and incubate at 18–26°C for 15 minutes. Protect immersed slides from direct light. Discard alkaline-dye mixture after use.
7. After 15 minutes incubation, remove slides from Coplin jar and rinse for 2 minutes in deionized water. Do not allow slides to dry.
8. Counterstain for 2 minutes. If using FRV-Alkaline Solution, counterstain with Hematoxylin Solution, Gill No. 3. If using FBB-Alkaline Solution, counterstain with Neutral Red Solution, Buffered.
9. Rinse slides thoroughly in tap water and air dry.
10. Evaluate microscopically. If coverslipping is required use only an aqueous mounting media.

Performance Characteristics

Method of Scoring

Scan the film (900X) and select a thin area where erythrocytes are barely touching. Sites of phosphatase activity will appear as blue or red granules, depending upon dye used. Select 100 consecutive segmented and band-form neutrophilic granulocytes. Rate from 0 to 4+ on the basis of quantity and intensity of precipitated dye within the cytoplasm of these cells. For characteristics of scoring, refer to Table 1. The sum of the ratings of 100 cells is regarded as the score.

Table 1. Characteristics of Scoring*

Precipitated Azo Dye in Cytoplasm				
Cell Rating	Amount** (%)	Granule Size	Staining Intensity	Background of Cytoplasm
0+	None	-	None	None
1+	50	Small	Faint to Moderate	Colorless to very pale pink or blue
2+	50-80	Small	Moderate to Strong	Colorless to pale pink or blue
3+	80-100	Medium to Large	Strong	Colorless to pink or blue
4+	100	Medium to Large	Brilliant	Not visible

* Table 1 represents modification of observations made by Kaplow.^{2,3}

** Percentage of volume of cytoplasm occupied by azo dye precipitate.

To obtain the leukocyte alkaline phosphatase activity (LAPA) score, the number of cells counted is multiplied by the value for cell rating. These figures are added to obtain the LAPA score as shown in the following examples:

Cell Rating	Counted Score	LAPA Score
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

The following scores from 40 healthy individuals were obtained at Sigma-Aldrich using the procedure described.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA Mean ± 1SD	76±31	94±39
LAPA Range	44-106	55-133

The range of normal scores is wide, varying from 20 to 180. The following range of scores were obtained from those 40 normal individuals:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

If observed results vary from expected results, please contact Sigma-Aldrich Technical Service for assistance.

Analytical Performance Characteristics

The analytical performance results for the given tests conducted on all target structures, confirm 100% sensitivity, specificity, and repeatability.

Cat. No	Product Description	Target	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity
861	Naphthol AS-BI Alkaline Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
862	FRV-Alkaline Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
863	FBB-Alkaline Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
914	Sodium Nitrite Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
915	Citrate Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
GHS3	Hematoxylin Solution, Gill NO 3	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
N6264	Neutral Red Solution, Buffered	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3

Warnings and Hazards

Refer to Safety Data Sheet and product labeling for any updated risk, hazard or safety information.

86C:



- H290 May be corrosive to metals.
- H302 Harmful if swallowed.
- H315 Causes skin irritation.
- H317 May cause an allergic skin reaction.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.
- P234 Keep only in original packaging.
- P273 Avoid release to the environment.
- P280 Wear protective gloves/ eye protection/ face protection.
- P301 + P312 IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor if you feel unwell.
- P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
- P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

86R:



- H290 May be corrosive to metals.
- H302 Harmful if swallowed.
- H315 Causes skin irritation.
- H318 Causes serious eye damage.
- H373 May cause damage to organs (Kidney) through prolonged or repeated exposure if swallowed.
- P234 Keep only in original packaging.
- P280 Wear protective gloves/ eye protection/ face protection.

- P301 + P312 IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/ doctor if you feel unwell.
- P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
- P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
- P314 Get medical advice/ attention if you feel unwell.

If during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

Symbol Definitions

Symbols as defined in EN ISO 15223-1:2021

	Manufacturer		Catalogue Number
	Consult Instructions for Use		Batch Code
	Authorized Representative in the European Community/European Union		European Union Declaration of Conformity (defined in IVDR 2017/746)
	Use-by Date		In vitro diagnostic medical device
	Temperature Limit		Caution
	Date of Manufacture		Importer
	Indicates the Authorised Representative in Switzerland		

References

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248-250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Contact Information

To place an order, please visit our web site at [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). For Technical Service, please visit the tech service page on our web site at [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revision History

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Transferred to new template with current branding. Specified for professional use in intended use and precautions. Revised intended use to align with IVDR guidelines. Updated Material Safety Data Sheet to Safety Data Sheet. Updated contact information. Removed instruction to follow CLSI for specimen collection. Removed EN 980 and changed to EN ISO 15223-1:2021 for symbols. Added adverse event contact information. Added a revision history table. Added Warnings and Hazards.Added CH-REP information.	
Rev. 6.0	2024
Corrected internal document number.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

The Initial M and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Anweisungen für den Gebrauch

Alkalische Phosphatase, Leukozyten – Kit

Verfahren Nr. 86



Verwendungszweck

Die alkalische Phosphatase-Kits von Sigma-Aldrich sind als allgemeine histologische Färbemittel für den Laborgebrauch bestimmt. Die Reagenzien für die alkalische Phosphatase sind für die professionelle „In-vitro-Diagnostik“ bestimmt. Dieses manuelle, qualitative, histochemische Verfahren weist die Aktivität von alkalischer Phosphatase in Leukozyten aus menschlichem Blut oder Knochenmarkausstrichen nach. Die histologische Visualisierung der Leukozyten-assoziierten alkalischen Phosphatase ist eine einzigartige Technik, die derzeit in der Medizin häufig eingesetzt wird.

Im hämatopoetischen Gewebe beschränkt sich die alkalische Phosphatase auf stabkernige und segmentkernige neutrophile Granulozyten.^{1,2} Der Nachweis des Enzyms durch die gleichzeitige Erfassung mit substituierten Naphtholen und Diazoniumsalzen ist möglicherweise das früheste Beispiel eines zytochemischen Enzymtests mit klinischer Bedeutung.³

Bei den meisten Verfahren, auch bei den Verfahren von Sigma-Aldrich, werden stabile Diazoniumsalze verwendet. Diese werden durch Reaktion eines Arylamins mit Natriumnitrit in einem sauren Medium gebildet.⁴ Das daraus entstandene Diazoniumchlorid (gewöhnlich instabil) kann anschließend mit Verbindungen wie Zinkchlorid, Zinksulfat oder Naphthalin-1,6-disulfonat behandelt werden, die stabile Salze bilden. Diese Stabilisatoren können einige Enzymsysteme erheblich hemmen. Diazoniumchloride wirken hingegen weniger hemmend.⁴ Aus diesem Grund bietet Sigma-Aldrich jetzt stabile Lösungen von Echtrötviolett LB-Base, Echtblau BB-Base und Natriumnitrit für die Zytochemie der alkalischen Phosphatase an. Zur weiteren Vereinfachung dieser Methoden ist eine stabile Naphthol AS-BI Phosphatlösung enthalten.

Zur Durchführung des Tests werden fixierte Blutaussstriche bei Raumtemperatur (18–26 °C) in einer Lösung inkubiert, die Naphthol AS-BI-Phosphat und frisch zubereitetes Echtrötviolettsalz LB oder Echtblausalz RR enthält (mit 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol AMPD gepuffert bei pH-Wert 9,5). Die Bereiche mit Aktivität erscheinen abhängig von der Wahl des Diazoniumsalzes entweder rot oder blau. Das Verfahren mit Echtrötviolett LB gleicht einer vorgeschlagenen NCCLS-Referenzmethode.⁵

Reagenzien

Alkalische Naphthol AS-BI Lösung (Kat.-Nr. 861-10ML)

Naphthol AS-BI-Phosphat, 4 mg/ml, in AMPD-Puffer, 2 mol/l, pH-Wert 9,5. Warnung. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizungen. Kann die Atemwege reizen. Einatmen von Dampf vermeiden.

Alkalische FRV-Lösung (Kat.-Nr. 862-10ML)

Echtrötviolett LB-Base, 5 mg/ml, in Salzsäure, 0,4 mol/l, mit Stabilisator. Warnung. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

Alkalische FBB-Lösung (Kat.-Nr. 863-10ML)

Echtblau BB-Base, 5 mg/ml, C.I. 37175, in Salzsäure, 0,4 mol/l, mit Stabilisator.

Natriumnitrit-Lösung (Kat.-Nr. 914-10ML)

Natriumnitrit, 0,1 mol/l

Citratlösung (Kat.-Nr. 915-50ML)

Zitronensäure, 18 mmol/l, Natriumcitrat, 9 mmol/l, Natriumchlorid, 12 mmol/l mit Tensid, gepuffert bei pH-Wert 3,6

Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3 (Kat.-Nr. GHS3-50ML)

Hämatoxylin, zertifiziert, 6,0 g/l, C.I. 75290, Natriumiodat, 0,6 g/l und Aluminiumsulfat, 52,8 g/l mit Stabilisatoren. Gefahr. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

Neutralrot-Lösung, gepuffert (Kat.-Nr. N6264-50ML)

Neutralrot, zertifiziert, 0,5 % w/v, C.I. 50040, in Acetatpuffer, pH-Wert 5,2. Mit Konservierungsmittel.

Spezielle Materialien, die erforderlich sind, aber nicht zur Verfügung gestellt werden

- Aceton, ACS-Reagenz
- Formaldehyd, 37 % ACS

Lagerung und Stabilität

Alkalische Naphthol AS-BI Lösung, Alkalische FRV-Lösung, Alkalische FBB-Lösung und Natriumnitritlösung im Kühlschrank (2–8 °C) lagern. Die Reagenzien sind bis zu dem Verfallsdatum haltbar. Die Citratlösung im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Die Lösung kann verwendet werden, wenn kein mikrobielles Wachstum vorhanden ist.

Hämatoxylin-Lösung und Neutralrot-Lösung bei Raumtemperatur (18–26 °C) lagern. Hämatoxylin-Lösung vor Licht schützen. Die Reagenzien sind bis zu dem Verfallsdatum haltbar.

Zerfall

Die Hämatoxylin-Lösung entsorgen, wenn sich die Lösung braun (Überoxidation durch Luft) oder violett (Säureverlust) färbt.

Vorbereitung

Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixiermittel: 25 ml Citratlösung, Kat.-Nr. 915-50ML, mit 65 ml Aceton und 8 ml 37%iger Formaldehydlösung versetzen. In eine Glasflasche füllen und fest

verschließen. Im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Vor dem Gebrauch auf 18–26 °C erwärmen. Bis zu 4 Wochen stabil, wenn die Lagerung fest verschlossen im Kühlschrank erfolgt.

Vorsichtsmaßnahmen

Diese IVDs sind für die In-vitro-Diagnostik in einer klinischen Laborumgebung bestimmt. Diese IVDs sind nur für den professionellen Gebrauch durch qualifiziertes Personal bestimmt. Die IVDs von Sigma-Aldrich können von Laborpersonal bedient werden, das im Umgang mit menschlichen Proben, die infektiös sein können, geschult ist, Mikroskope und andere Laborgeräte bedienen kann und über eine Farbwahrnehmung und Sehschärfe verfügt, um Farben und andere Objekte unter dem Mikroskop zu unterscheiden.

Beim Umgang mit Laborreagenzien sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Entsorgen Sie den Abfall unter Einhaltung aller örtlichen, staatlichen, regionalen oder nationalen Vorschriften.

Verfahren

Probenentnahme

Keine bekannte Testmethode kann vollständige Sicherheit bieten, dass Blutproben oder Gewebe keine Infektion übertragen. Daher sollten alle Blutderivate oder Gewebeproben als potenziell infektiös betrachtet werden.

Es können frische Blut- oder Knochenmarkausstriche oder mit Heparin antikoagulierte Proben verwendet werden.⁵ EDTA VERMEIDEN.⁵ Blutaussstriche sollten innerhalb von 8 Stunden nach der Zubereitung zum Nachweis der Enzymaktivität angefärbt werden. Sollte dies nicht möglich sein, kann der allmähliche Verlust der Aktivität der alkalischen Phosphatase durch Fixierung und Lagerung über Nacht im Gefrierschrank verzögert werden.⁵ Die Ausstriche sind mindestens 1 Stunde vor dem Fixieren und 3 Stunden nach dem Fixieren vor dem Einfrieren zu trocknen.

Anmerkungen

Das Verfahren unter Verwendung von Positivkontrollen durchführen. Diese können von Patienten mit pyogener Leukozytose oder von Frauen im dritten Trimester der Schwangerschaft oder in den ersten Tagen nach der Geburt gewonnen werden. Bei diesen Personengruppen liegt der Wert der alkalischen Phosphatase der Leukozyten gewöhnlich über 100. Eine Negativkontrolle kann aus einem normalen fixierten Ausstrich hergestellt werden, indem dieser zur Inaktivierung des Enzyms für 1 Minute in kochendes Wasser getaucht wird. Kontrollausstriche sind bis zu 1 Jahr haltbar, wenn sie fixiert und in Parafilm® verpackt bei -70 °C gelagert werden. Diese Ausstriche sollten mindestens 1 Stunde vor dem Fixieren und 3 Stunden nach dem Fixieren vor dem Einfrieren getrocknet werden.

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen zu erwartenden Bereich bestimmt, der für die lokale Bevölkerung charakteristisch ist.

Das Verfahren basiert auf der subjektiven Bewertung der gefärbten Zellen. Dies kann zu einer erheblichen Schwankung bei den ermittelten Bewertungen führen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches muss zwischen 18 und 26 °C gehalten werden. Bei niedrigeren Temperaturen fallen die Ergebnisse deutlich niedriger aus. Bei Temperaturen über 30 °C steigt die Aktivität deutlich an. Eosinophile lassen sich nicht anfärben, sind aber anhand der zweigeteilten Zellkerne und der großen refraktilen Granula zu erkennen.

Bisher liegen nur wenige Daten über Verbindungen vor, die möglicherweise die Aktivität der leukozytären alkalischen Phosphatase (LAPA) beeinträchtigen. Es ist bekannt, dass einige Medikamente und andere Substanzen die Aktivität der zirkulierenden alkalischen Phosphatase beeinflussen können.⁶ Orale Kontrazeptiva, Cortisol und Stress können zu erhöhten Werten der leukozytären alkalischen Phosphatase führen.³

Beim Menschen ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase auf reife und stabförmige Granulozyten beschränkt. Gelegentlich kann eine schwache Färbung der Lymphozyten beobachtet werden. Osteoblasten und Endothelzellen im Knochenmark zeigen eine starke Färbung.

Verfahren

- HINWEIS:** Bei Verwendung von Columbia-Färbetönen das Reagenz volumen durch 5 teilen.
1. 45 ml entionisiertes Wasser abmessen und die Temperatur auf 18–26 °C einstellen.
 2. Herstellung der Diazoniumsalzlösung:
1 ml Natriumnitritlösung zu 1 ml alkalischer FRV-Lösung hinzufügen
ODER
1 ml Natriumnitritlösung zu 1 ml alkalischer FBB-Lösung hinzufügen. Das Ganze durch vorsichtiges Schwenken mischen. 2 Minuten ruhen lassen.
 3. Die in Schritt 2 vorbereitete Lösung zu dem entionisierten Wasser aus Schritt 1 geben.
 4. 1 ml der alkalischen Naphthol AS-BI Lösung zur verdünnten Diazoniumsalzlösung (Schritt 3) geben. Gut mischen und in einen Coplin-Färbetrog geben.
 5. Das Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixiermittel auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen. Die Objektträger durch Eintauchen in die Fixierlösung für 30 Sekunden fixieren. Vorsichtig 45 Sekunden lang mit entionisiertem Wasser abspülen. Die Objektträger nicht trocknen lassen.
 6. Die Objektträger in die alkalische Farbmischung (Schritt 4) geben und für 15 Minuten bei 18–26 °C inkubieren. Die eingetauchten Objektträger vor direktem Licht schützen. Die alkalische Farbstofflösung nach Gebrauch entsorgen.
 7. Die Objektträger nach 15 Minuten Inkubation aus dem Coplin-Färbetrog entfernen und 2 Minuten lang mit entionisiertem Wasser abspülen. Die Objektträger nicht trocknen lassen.
 8. 2 Minuten lang gegenfärben. Bei Verwendung der alkalischen FRV-Lösung die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, vornehmen. Bei Verwendung der alkalischen FBB-Lösung die Gegenfärbung mit gepufferter Neutralrot-Lösung durchführen.
 9. Die Objektträger gründlich in Leitungswasser abspülen und an der Luft trocknen lassen.
 10. Mikroskopisch untersuchen. Wenn das Abdecken mit einem Deckglas erforderlich ist, darf nur ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden.

Leistungsmerkmale

Bewertungsverfahren

Den Ausstrich scannen (900-fache Vergrößerung) und einen dünnen Bereich auswählen, in dem die Erythrozyten sich kaum berühren. Bereiche mit Phosphataseaktivität erscheinen, abhängig vom verwendeten Farbstoff, als blaue oder rote Granula. 100 konsekutive segmentkernige und stabkernige neutrophile Granulozyten auswählen. Die Bewertung reicht von 0 bis 4+ auf der Grundlage der Menge und Intensität des ausgefallenen Farbstoffs im Zytoplasma dieser Zellen. Angaben zu den Charakteristika der Bewertung sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Summe der Beurteilungen von 100 Zellen wird als Ergebnis gewertet.

Tabelle 1. Charakteristika der Bewertung*

Ausgefallener Azofarbstoff im Zytoplasma				
Beurteilung der Zelle	Menge** (%)	Größe der Granula	Intensität der Färbung	Zytoplasma-Hintergrund
0+	Kein	-	Kein	Kein
1+	50	Klein	Schwach bis mäßig	Farblos bis sehr blassrosa bzw -blau
2+	50-80	Klein	Mäßig bis stark	Farblos bis blassrosa bzw -blau
3+	80-100	Mittel bis groß	Stark	Farblos bis rosa bzw. blau
4+	100	Mittel bis groß	Leuchtend	Nicht sichtbar

* Tabelle 1 zeigt eine Abwandlung der von Kaplow gemachten Beobachtungen.^{2,3}

** Prozentualer Anteil des Zytoplasmavolumens, das vom Präzipitat eines Azofarbstoffs eingenommen wird.

Zur Ermittlung der leukozytären alkalischen Phosphatase-Aktivität (LAPA) wird die Anzahl der gezählten Zellen mit dem Wert für die Beurteilung der Zellen multipliziert. Diese Zahlen werden zur Ermittlung des LAPA-Wertes addiert, wie in den folgenden Beispielen gezeigt:

Beurteilung der Zelle	Gezählter Wert	LAPA-Wert
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Gesamt	100	67

Die folgenden Werte von 40 gesunden Personen wurden bei Sigma-Aldrich nach dem beschriebenen Verfahren ermittelt.

	Echtrotviolett LB	Echtblau BB
LAPA Mittelwert $\pm$ 1 SD	76 $\pm$ 31	94 $\pm$ 39
LAPA-Bereich	44-106	55-133

Die Bandbreite der normalen Werte ist groß und reicht von 20 bis 180. Die folgenden Werte wurden von diesen 40 gesunden Personen ermittelt:

Echtrotviolett LB	Echtblau BB
20-146	25-180

Wenn die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen abweichen, wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von Sigma-Aldrich, um Unterstützung zu erhalten.

Analytische Leistungsmerkmale

Die Ergebnisse der analytischen Leistung für die gegebenen Tests, die für alle Zielstrukturen durchgeführt wurden, bestätigen eine 100%ige Sensitivität, Spezifität und Wiederholbarkeit.

Kat.-Nr.	Beschreibung des Produkts	Ziel	Intra-Assay-Spezifität	Intra-Assay-Empfindlichkeit	Inter-Assay-Spezifität	Inter-Assay-Empfindlichkeit
861	Alkalische Naphthol AS-BI Lösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
862	Alkalische FRV-Lösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
863	Alkalische FBB-Lösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
914	Natriumnitrit-Lösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
915	Citratlösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
GHS3	Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
N6264	Neutralrot-Lösung, gepuffert	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3

Warnungen und Gefahren

Aktuelle Risiko-, Gefahren- und Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt und auf der Produktkennzeichnung.

86C:



- H290 Kann ätzend auf Metalle wirken.
- H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann eine allergische Reaktion der Haut verursachen.
- H319 Verursacht schwere Augenreizungen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H411 Giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- P234 Nur in der Originalverpackung aufbewahren.
- P273 Freisetzung in die Umwelt ist zu vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

- P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE/einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.
- P302 + P352 BEI HAUTKONTAKT: Mit viel Wasser waschen.
- P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Kontaktlinsen entfernen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter spülen.

86R:



- H290 Kann ätzend auf Metalle wirken.
- H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- H315 Verursacht Hautreizungen.

- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H373 Kann bei Verschlucken bei längerer oder wiederholter Exposition die Organe (Niere) schädigen.
- P234 Nur in der Originalverpackung aufbewahren.
- P280 Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE/einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.
- P302 + P352 BEI HAUTKONTAKT: Mit viel Wasser waschen.
- P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Kontaktlinsen entfernen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter spülen.
- P314 Holen Sie sich ärztlichen Rat/ärztliche Hilfe, wenn Sie sich unwohl fühlen.

Wenn während der Verwendung dieses Geräts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall eingetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und/oder seinem bevollmächtigten Vertreter sowie Ihrer nationalen Behörde.

Symbol-Definitionen

Symbole gemäß der Definition in EN ISO 15223-1:2021

	Hersteller		Katalognummer
	Anweisungen für den Gebrauch beachten		Chargencode
	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union		Konformitätserklärung der Europäischen Union (definiert in IVDR 2017/746)
	Verfallsdatum		Medizinisches In-vitro-Diagnosegerät
	Temperatur-Grenzwert		Vorsicht
	Datum der Herstellung		Importeur
	Bezeichnet den Bevollmächtigten in der Schweiz.		

Referenzen

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Vorgeschlagene Norm: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Kontaktinformationen

Um eine Bestellung aufzugeben, besuchen Sie bitte unsere Website unter [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Für den technischen Service besuchen Sie bitte die technische Service-Seite auf unserer Website unter [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorie

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Die neue Vorlage mit aktuellem Branding wurde angewandt. In Verwendungszweck und Vorsichtsmaßnahmen wurde die Nennung der gewerblichen Verwendung hinzugefügt. Überarbeitung des Verwendungszwecks zur Angleichung an die IVDR-Richtlinien. Material Sicherheitsdatenblatt wurde in Sicherheitsdatenblatt geändert. Kontaktinformationen wurden aktualisiert. Die Anweisung, CLSI für die Probenentnahme zu befolgen, wurde entfernt. EN 980 wurde gestrichen und in EN ISO 15223-1:2021 für Symbole geändert. Kontaktinformationen für unerwünschte Ereignisse wurden hinzugefügt. Eine Tabelle zur Revisionshistorie wurde hinzugefügt. Warn- und Gefahrenhinweise hinzugefügt. Informationen zum Bevollmächtigten in der Schweiz hinzugefügt.	
Rev. 6.0	2024
Interne Dokumentennummer korrigiert.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Die Initiale M und Sigma-Aldrich sind Marken der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, oder ihrer Tochtergesellschaften. Alle anderen Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber. Ausführliche Informationen über Marken sind über öffentlich zugängliche Quellen erhältlich.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Mode d'emploi

Kit de phosphatase alcaline leucocytaire

Procédure n° 86



Utilisation prévue

Les kits de phosphatase alcaline de Sigma-Aldrich sont destinés à la coloration histologique générale en laboratoire. Les réactifs de détection de la phosphatase alcaline sont destinés aux professionnels et à un "usage en diagnostic *in vitro*" uniquement. Cette procédure histochimique manuelle et qualitative met en évidence l'activité de la phosphatase alcaline dans les leucocytes des frottis sanguins ou de moelle osseuse humains. La visualisation histologique de la phosphatase alcaline associée aux leucocytes est une technique unique couramment utilisée en médecine.

Dans le tissu hématopoïétique, la phosphatase alcaline semble être limitée aux neutrophiles en bande et segmentés^{1,2}. Sa mise en évidence par capture simultanée à l'aide de naphthols substitués et de sels de diazonium est peut-être le premier exemple de test enzymatique cytochimique ayant une signification clinique³.

La plupart des procédures, y compris celles fournies par Sigma-Aldrich, utilisent des sels de diazonium stables. Ces sels sont formés en faisant réagir une arylamine avec du nitrite de sodium en milieu acide⁴. Le chlorure de diazonium qui en résulte (généralement instable) peut ensuite être traité avec des composés tels que du chlorure de zinc, du sulfate de zinc ou du naphthalène-1,6-disulfonate, formant ainsi des sels stables. Ces stabilisateurs peuvent exercer une inhibition marquée sur certains systèmes enzymatiques, alors que les chlorures de diazonium sont moins inhibiteurs⁴. C'est pourquoi Sigma-Aldrich propose désormais des solutions stables de Fast Red Violet LB Base, de Fast Blue BB Base et de nitrite de sodium pour la cytochimie de la phosphatase alcaline. Pour simplifier davantage ces méthodes, une solution stable de phosphate de naphthol AS-BI est également incluse.

Pour réaliser le test, les frottis sanguins fixés sont incubés à température ambiante (entre 18 et 26 °C) dans une solution contenant du phosphate de naphthol AS-BI et du sel Fast Red Violet LB ou du sel Fast Blue BB fraîchement préparé, tamponné à un pH de 9,5 avec du 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol (AMPD). Les sites d'activité sont rouges ou bleus, selon le choix du sel de diazonium. La procédure intégrant le Fast Red Violet LB est similaire à une méthode de référence proposée par le NCCLS⁵.

Réactifs

Solution alcaline de naphthol AS-BI (réf. 861-10ML)

Phosphate de naphthol AS-BI, 4 mg/ml, dans un tampon AMPD, 2 mol/l, pH 9,5. Avertissement. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires. Éviter de respirer les vapeurs.

Solution alcaline-FRV (réf. 862-10ML)

Fast Red Violet LB Base, 5 mg/ml, dans de l'acide chlorhydrique, 0,4 mol/l, avec stabilisateur. Avertissement. Nocif en cas d'ingestion.

Solution alcaline-FBB (réf. 863-10ML)

Fast Blue BB Base, 5 mg/ml, C.I. 37175 dans de l'acide chlorhydrique à 0,4 mol/l avec stabilisateur.

Solution de nitrite de sodium (réf. 914-10ML)

Nitrite de sodium, 0,1 mol/l.

Solution de citrate (réf. 915-50ML)

Acide citrique, 18 mmol/l, citrate de sodium, 9 mmol/l, chlorure de sodium, 12 mmol/l avec agent tensioactif, tamponné à un pH de 3,6.

Solution d'hématoxyline de Gill n° 3 (réf. GHS3-50ML)

Hématoxyline, certifiée, 6,0 g/l, C.I. 75290, iodate de sodium, 0,6 g/l, et sulfate d'aluminium, 52,8 g/l, avec stabilisateurs. Danger. Nocif en cas d'ingestion. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Solution de rouge neutre, tamponnée (réf. N6264-50ML)

Rouge neutre, certifié, 0,5 % p/v, C.I. 50040, dans un tampon acétate, pH 5,2. Conservateur ajouté.

Matériel spécial requis mais non fourni

- Acétone, de qualité réactif ou de qualité ACS
- Formaldéhyde, 37 %, de qualité ACS

Conservation et stabilité

Conserver la solution alcaline de naphthol AS-BI, la solution alcaline-FRV, la solution alcaline-FBB et la solution de nitrite de sodium au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation. Conserver la solution de citrate au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Cette solution peut être utilisée en l'absence de croissance microbienne.

Conserver la solution d'hématoxyline et la solution de rouge neutre à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Conserver la solution d'hématoxyline à l'abri de la lumière. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation.

Détérioration

Jeter la solution d'hématoxyline si elle devient marron (trop oxydée par l'air) ou violette (perte d'acidité).

Préparation

Les réactifs sont fournis prêts à l'emploi.

Fixateur à base de citrate-acétone-formaldéhyde : ajouter 65 ml d'acétone et 8 ml de formaldéhyde à 37 % à 25 ml de solution de citrate, réf. 915-50ML. Verser la solution dans un flacon en verre et boucher hermétiquement. Conserver cette solution au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). L'équilibrer entre 18 et 26 °C avant de l'utiliser. Elle est stable jusqu'à 4 semaines si elle est conservée hermétiquement fermée au réfrigérateur.

Précautions

Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à être utilisés en diagnostic *in vitro* au sein de laboratoires de biologie médicale. Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à un usage professionnel par un personnel qualifié uniquement. Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de Sigma-Aldrich peuvent être utilisés par le personnel de laboratoire formé à la manipulation d'échantillons humains potentiellement infectieux, à l'utilisation de microscopes et d'autres équipements de laboratoire et possédant une perception des couleurs et une acuité visuelle permettant de distinguer les couleurs ainsi que les autres objets au microscope.

Suivre les précautions habituelles lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets en respectant toutes les réglementations locales et nationales.

Procédure

Prélèvement des échantillons

Aucune méthode de test connue ne peut totalement garantir que les échantillons de sang ou de tissus ne transmettront pas d'infection. Par conséquent, tous les produits sanguins ou échantillons de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Il est possible d'utiliser des frottis sanguins ou médullaires fraîchement préparés ou bien des échantillons anticoagulés avec de l'héparine⁶. ÉVITER L'EDTA⁵. Les frottis sanguins doivent être colorés dans les 8 heures suivant leur préparation pour rechercher l'activité enzymatique. Toutefois, si cela n'est pas possible, la perte progressive de l'activité de la phosphatase alcaline peut être retardée en les fixant et en les stockant toute une nuit au congélateur⁵. Les frottis doivent être séchés pendant au moins 1 heure avant de les fixer et pendant 3 heures après avoir été fixés pour pouvoir être congelés.

Remarques

Réaliser la procédure en utilisant des contrôles positifs. Ces contrôles peuvent provenir de patients atteints d'une hyperleucocytose d'origine infectieuse ou bien de femmes au troisième trimestre de grossesse ou pendant les premiers jours après la naissance. Les scores de la phosphatase alcaline leucocytaire chez ces personnes dépassent généralement 100. Un contrôle négatif peut être préparé à partir d'un frottis fixé normal en l'immergeant dans de l'eau bouillante pendant 1 minute afin d'inactiver l'enzyme. Les frottis de contrôle peuvent être conservés jusqu'à 1 an s'ils sont stockés fixés, enveloppés dans du Parafilm® à -70 °C. Ces frottis doivent être séchés pendant au moins 1 heure avant d'être fixés et pendant 3 heures après avoir été fixés pour pouvoir être congelés.

Il est vivement recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de valeurs attendues, caractéristique de la population locale.

La procédure dépend de l'évaluation subjective des cellules colorées. Cela peut entraîner une grande variation des scores obtenus. La température du mélange réactionnel doit être maintenue entre 18 et 26 °C. Des températures plus basses entraînent des résultats (scores) nettement inférieurs. Au-dessus de 30 °C, une augmentation marquée de l'activité se produit. Les éosinophiles ne se colorent pas, mais ils peuvent être reconnus grâce à leurs noyaux bilobés et à la présence de gros granules réfractaires.

Il existe peu de données concernant les composés susceptibles d'interférer avec l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire (PAL). Certains médicaments et d'autres substances sont connus comme ayant un impact sur l'activité de la phosphatase alcaline circulante⁶. Les contraceptifs oraux, le cortisol et le stress peuvent entraîner une augmentation des scores de la phosphatase alcaline leucocytaire⁶.

Chez l'homme, l'activité de la phosphatase alcaline est limitée aux granulocytes matures et aux granulocytes en bande. Parfois, une faible coloration peut être observée dans les lymphocytes. Les ostéoblastes de la moelle osseuse et les cellules endothéliales sont fortement colorés.

Procédure

REMARQUE : En cas d'utilisation de cuves à coloration Columbia, diviser les volumes des réactifs par 5.

1. Mesurer 45 ml d'eau déionisée et ajuster la température entre 18 et 26 °C.
2. Préparer la solution de sel de diazonium :
Ajouter 1 ml de solution de nitrite de sodium à 1 ml de solution alcaline-FRV OU
Ajouter 1 ml de solution de nitrite de sodium à 1 ml de solution alcaline-FBB. Mélanger délicatement par inversion. Laisser reposer pendant 2 minutes.
3. Ajouter la solution préparée à l'étape 2 à l'eau déionisée de l'étape 1.
4. Ajouter 1 ml de solution alcaline de naphthol AS-BI à la solution de sel de diazonium diluée (étape 3). Mélanger soigneusement et verser dans une cuve à coloration de Coplin.
5. Équilibrer le fixateur à base de citrate-acétone-formaldéhyde à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Fixer les lames en les immergeant dans la solution de fixation pendant 30 secondes. Rincer délicatement à l'eau déionisée pendant 45 secondes. Ne pas laisser les lames sécher.
6. Ajouter les lames au mélange colorant alcalin (étape 4) et laisser incubé entre 18 et 26 °C pendant 15 minutes. Protéger les lames immergées de la lumière directe. Jeter le mélange colorant alcalin après utilisation.
7. Après les 15 minutes d'incubation, retirer les lames de la cuve à coloration de Coplin et les rincer pendant 2 minutes dans de l'eau déionisée. Ne pas laisser les lames sécher.
8. Contre-colorer pendant 2 minutes. Si la solution alcaline-FRV est utilisée, contre-colorer avec la solution d'hématoxyline de Gill n° 3. Si la solution alcaline-FBB est utilisée, contre-colorer avec la solution de rouge neutre tamponnée.
9. Rincer soigneusement les lames avec de l'eau de ville et les laisser sécher à l'air libre.
10. Examiner les lames au microscope. S'il est nécessaire de monter les lames avec des lamelles couvre-objet, utiliser uniquement un milieu de montage aqueux.

Caractéristiques de performance

Méthode de détermination du score

Examiner le frottis (à l'objectif 900x) et sélectionner une petite zone où les érythrocytes se touchent à peine. Les sites d'activité de la phosphatase apparaissent sous forme de granulations bleues ou rouges, selon le colorant utilisé. Sélectionner 100 granulocytes neutrophiles segmentés et en forme de bande consécutifs. Leur attribuer un score compris entre 0 et 4+ en fonction de la quantité et de l'intensité du colorant précipité à l'intérieur du cytoplasme de ces cellules. Pour les caractéristiques de détermination du score, voir le Tableau 1. La somme des scores de 100 cellules est considérée comme le score final.

Tableau 1. Caractéristiques de détermination du score*

Colorant azoïque précipité à l'intérieur du cytoplasme				
Score des cellules	Quantité** (%)	Taille des granulations	Intensité de la coloration	Fond du cytoplasme
0+	Aucune	-	Aucune	Aucune
1+	50	Petite	Faible à modérée	Incolore à rose ou bleu très pâle
2+	50-80	Petite	Modérée à forte	Incolore à rose ou bleu pâle
3+	80-100	Moyenne à grande	Forte	Incolore à rose ou bleu
4+	100	Moyenne à grande	Intense	Non visible

* Le Tableau 1 constitue une modification des observations faites par Kaplow^{2, 3}.

** Pourcentage du volume du cytoplasme occupé par le colorant azoïque précipité.

Pour obtenir le score d'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire (activité PAL), le nombre de cellules comptées est multiplié par la valeur du score des cellules. Ces chiffres sont ensuite additionnés pour obtenir le score final d'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire, comme le montrent les exemples suivants :

Score des cellules	Score compté	Score d'activité PAL
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

Les scores suivants issus de 40 individus en bonne santé ont été obtenus chez Sigma-Aldrich en utilisant la procédure décrite.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Activité PAL moyenne ± 1 ET	76±31	94±39
Plage activité PAL	44-106	55-133

La plage des scores normaux est large, allant de 20 à 180. La plage suivante de scores a été obtenue à partir de ces 40 individus en bonne santé :

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Si les résultats observés diffèrent des résultats attendus, contacter le service technique de Sigma-Aldrich pour obtenir de l'aide.

Caractéristiques de performance analytique

Les résultats des performances analytiques pour les tests concernés effectués sur toutes les structures cibles confirment une sensibilité, une spécificité et une répétabilité de 100 %.

Réf.	Description du produit	Cible	Spécificité intra-série	Sensibilité intra-série	Spécificité inter-séries	Sensibilité inter-séries
861	Solution alcaline de naphтол AS-BI	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
862	Solution alcaline-FRV	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
863	Solution alcaline-FBB	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
914	Solution de nitrite de sodium	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
915	Solution de citrate	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
GHS3	Solution d'hématoxiline de Gill n° 3	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
N6264	Solution de rouge neutre, tamponnée	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3

Avertissements et risques

Se reporter à la fiche de données de sécurité et à l'étiquetage du produit pour obtenir des informations mises à jour concernant les risques, les dangers et la sécurité.

86C :



H290 Peut être corrosif pour les métaux.

H302 Nocif en cas d'ingestion.

H315 Provoque une irritation cutanée.

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H335 Peut irriter les voies respiratoires.

H411 Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P234 Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P273 Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P301 + P312 EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P302 + P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau.

P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

86R :



H290 Peut être corrosif pour les métaux.

H302 Nocif en cas d'ingestion.

H315 Provoque une irritation cutanée.

H318 Provoque des lésions oculaires graves.

H373 Risque présumé d'effets graves pour les organes (reins) à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée par ingestion.

P234 Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P280 Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P301 + P312 EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

P302 + P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau.

P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P314 Consulter un médecin en cas de malaise.

Si, au cours de l'utilisation de ce dispositif ou à la suite de son utilisation, un incident grave se produit, le signaler au fabricant et/ou à son représentant agréé ainsi qu'aux autorités nationales compétentes.

Définition des symboles

Symboles tels que définis dans la norme EN ISO 15223-1:2021

	Fabricant		Référence
	Consulter le mode d'emploi		Numéro du lot
	Représentant agréé dans la Communauté européenne/l'Union européenne		Déclaration de conformité de l'Union européenne (définie dans le règlement 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i>)
	Date limite d'utilisation		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Limites de température		Attention
	Date de fabrication		Importateur
	Indique le représentant agréé en Suisse		

Références

- 1. Kay H.D.: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- 2. Kaplow L.S.: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- 3. Elias J.M.: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248-250
- 4. Burstone M.S.: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- 5. Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- 6. Young D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- 7. Kaplow L.S.: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Coordonnées

Pour passer commande, consulter notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Pour le service technique, consulter la page du service technique sur notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historique des révisions

Rév. 3.0	2014
Rév. 4.0	2016
Rév. 5.0	2023
	Transfert vers un nouveau modèle avec l'image de marque actuelle. Précision de l'usage professionnel dans l'utilisation prévue et les précautions. Révision de l'utilisation prévue afin de l'aligner sur les recommandations de la réglementation relative aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i> . Remplacement du texte "Material Safety Data Sheet" par "Safety Data Sheet" dans la version anglaise. Mise à jour des coordonnées. Suppression de l'instruction indiquant de suivre les normes et recommandations du CLSI pour le prélèvement des échantillons. Remplacement de la norme EN 980 par la norme EN ISO 15223-1:2021 pour les symboles. Ajout de coordonnées en cas d'événements indésirables. Ajout d'un tableau d'historique des révisions. Ajout de la section relative aux avertissements et risques. Ajout des informations relatives au représentant suisse.
Rév. 6.0	2024
	Correction du numéro de document interne.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Le M majuscule et Sigma-Aldrich sont des marques de commerce de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne ou de ses filiales. Toutes les autres marques sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. Des informations détaillées sur les marques de commerce sont disponibles via des ressources accessibles au public.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Istruzioni per l'uso

Kit per fosfatasi alcalina leucocitaria

Procedura n. 86



Uso previsto

I kit per fosfatasi alcalina Sigma-Aldrich sono intesi come coloranti istologici generali per uso di laboratorio. I reagenti per fosfatasi alcalina sono destinati soltanto alla "diagnostica in vitro" professionale. Questa procedura qualitativa manuale istochimica rileva l'attività di fosfatasi alcalina nei leucociti di strisci ematici o midollari di campioni umani. La visualizzazione istologica della fosfatasi alcalina associata ai leucociti è una tecnica unica al momento comunemente utilizzata in medicina.

Nel tessuto ematopoietico, la fosfatasi alcalina appare limitata ai neutrofili bandati e segmentati.^{1,2} La sua dimostrazione tramite acquisizione simultanea utilizzando sostituti di naftoli e sali di diazonio è, forse, il primo esempio di test citochimico per l'identificazione dell'attività enzimatica avente valenza clinica.³

La maggior parte delle procedure, incluse quelle fornite da Sigma-Aldrich, utilizza sali di diazonio stabili. Questi derivano dalla reazione di arilamina con nitrito di sodio in un mezzo acido.⁴ Il risultante cloruro di diazonio (solitamente instabile) può essere quindi trattato con composti quali cloruro di zinco, solfato di zinco o naftalene-1,6-disolfonato, formando sali stabili. A differenza dei cloruri di diazonio, questi stabilizzanti possono essere fortemente inibenti verso alcuni sistemi enzimatici.⁴ Per questo motivo, Sigma-Aldrich fornisce ora soluzioni stabili di Fast Red Violet LB Base, Fast Blue BB Base e nitrito di sodio per la citochimica della fosfatasi acida. Per semplificare ulteriormente questo metodo, la dotazione include una soluzione stabile di naftolo AS-BI fosfato.

Per eseguire il test, incubare gli strisci ematici fissati a temperatura ambiente (18-26 °C) in una soluzione contenente naftolo AS-BI fosfato e sale Fast Red Violet LB preparato al momento o sale Fast Blue BB tamponato a pH 9,5 con 2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo (AMPD). Le sedi di attività sono di colore rosso o blu in funzione della scelta del sale di diazonio. La procedura che include Fast Red Violet LB è simile a un metodo di riferimento approvato dall'NCCLS proposto.⁵

Reagenti

Soluzione alcalina di naftolo AS-BI (N. di cat. 861-10ML)

Naftolo AS-BI fosfato, 4 mg/ml, in tampone con AMPD, 2 mol/l, pH 9,5. Avvertenza. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può irritare le vie respiratorie. Evitare di respirare i vapori.

Soluzione alcalina FRV (N. di cat. 862-10ML)

Base Fast red violet LB, 5 mg/ml, in acido cloridrico, 0,4 mol/l, con stabilizzante. Avvertenza. Nociva se ingerita.

Soluzione alcalina FBB (N. di cat. 863-10ML)

Soluzione Fast blue BB base, 5 mg/ml, C.I. 37175, in acido cloridrico, 0,4 mol/l, con stabilizzante.

Soluzione di nitrito di sodio (N. di cat. 914-10ML)

Nitrito di sodio, 0,1 mol/l.

Soluzione di citrato (N. di cat. 915-50ML)

Acido citrico, 18 mmol/l, citrato di sodio, 9 mmol/l, cloruro di sodio, 12 mmol/l con tensioattivo, tamponato a pH 3,6.

Soluzione di ematosilina di Gill, N. 3 (N. di cat. GHS3-50ML)

Ematosilina, certificata, 6,0 g/l, C.I. 75290, iodato di sodio, 0,6 g/l e solfato di alluminio, 52,8 g/l, con stabilizzanti. Pericolo. Nociva se ingerita. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

Soluzione di rosso neutro, tamponata (N. di cat. N6264-50ML)

Rosso neutro, certificato, 0,5% p/v, C.I. 50040, in tampone acetato, pH 5,2. Aggiunto conservante.

Materiali specifici necessari, ma non forniti in dotazione

- Acetone, reagente grado ACS
- Formaldeide, 37% ACS

Conservazione e stabilità

Conservare la soluzione alcalina di naftolo AS-BI, la soluzione alcalina FRV, la soluzione alcalina FBB e la soluzione di nitrito di sodio in frigorifero (2-8 °C). I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Conservare la soluzione di citrato in frigorifero (2-8 °C). La soluzione è idonea per l'uso in assenza di crescita microbica.

Conservare la soluzione di ematosilina e la soluzione di rosso neutro a temperatura ambiente (18-26 °C). Tenere la soluzione di ematosilina al riparo dalla luce. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

Deterioramento

Scartare la soluzione di ematosilina se diventa marrone (iperossidazione causata dall'aria) o porpora (perdita di acidità).

Preparazione

I reagenti sono forniti pronti per l'uso.

Fissativo a base di citrato-acetone-formaldeide: aggiungere 65 ml di acetone e 8 ml di formaldeide al 37% a 25 ml di soluzione di citrato, N. di cat. 915-50ML. Versare in un flaconcino di vetro e avvitare bene il tappo. Conservare in frigorifero (2-8 °C). Scaldare a 18-26 °C prima dell'uso. Stabile fino a 4 settimane se conservato ben chiuso in frigorifero.

Precauzioni

Questi IVD sono destinati alla diagnostica in vitro in un ambiente di laboratorio clinico. Questi IVD sono destinati esclusivamente all'uso professionale da parte di personale qualificato. Gli IVD Sigma-Aldrich devono essere utilizzati da personale di laboratorio addestrato alla manipolazione di campioni biologici umani potenzialmente infettivi, come anche all'uso di microscopi e altre apparecchiature di laboratorio, che abbia la percezione del colore e l'acuità visiva necessari a distinguere i colori e altri oggetti al microscopio.

Seguire le normali precauzioni adottate nella manipolazione dei reagenti di laboratorio. Smettere i rifiuti attenendosi a tutte le normative vigenti a livello locale, provinciale, regionale o nazionale.

Procedura

Raccolta dei campioni

Nessun metodo di analisi noto può garantire in modo assoluto che i campioni di sangue o tessuto non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i derivati del sangue o i campioni di tessuto devono essere considerati potenzialmente infettivi.

È possibile utilizzare strisci o campioni di sangue o midollo osseo preparati al momento, con eparina.⁵ EVITARE EDTA.⁵ Gli strisci ematici devono essere colorati per l'attività enzimatica entro 8 ore dalla preparazione. Tuttavia, se ciò non fosse possibile, la graduale perdita di attività della fosfatasi alcalina può essere ritardata mediante fissazione e conservazione durante la notte in congelatore.⁵ Gli strisci devono essere asciugati almeno 1 ora prima della fissazione e 3 ore dopo la fissazione prima di riporli in congelatore.

Note

Eseguire la procedura utilizzando controlli positivi. Questi possono essere ottenuti da pazienti con leucocitosi piogenica o da donne al terzo trimestre di gravidanza o durante i primi giorni dopo il parto. I punteggi assegnati alla valutazione della fosfatasi alcalina leucocitaria in questi individui sono in genere superiori a 100. È possibile preparare un controllo negativo da un normale striscio fissato immergendolo in acqua bollente per 1 minuto per inattivare l'enzima. Gli strisci di controllo possono essere conservati fino a 1 anno se fissati, avvolti in Parafilm® a -70 °C. Questi strisci devono essere asciugati almeno 1 ora prima della fissazione e 3 ore dopo la fissazione prima di essere riposti in congelatore.

Si raccomanda vivamente che ogni laboratorio stabilisca un proprio range di riferimento, caratteristico per la popolazione locale.

La procedura dipende dalla valutazione soggettiva delle cellule colorate. Ciò può comportare un'ampia variazione delle valutazioni ottenute. La temperatura della miscela di reazione deve essere mantenuta tra 18 °C e 26 °C. Temperature più basse daranno punteggi significativamente più bassi. In caso di temperature superiori a 30 °C si verificheranno punteggi marcatamente più elevati. Gli eosinofili non si colorano, ma si possono riconoscere dai nuclei bilobati e dai grossi granuli refrattari.

Sono scarsi i dati riguardanti i composti che possono interferire con l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (LAPA). È noto che alcuni farmaci e altre sostanze influenzano l'attività della fosfatasi alcalina in circolo.⁶ I contraccettivi orali, il cortisolo e lo stress possono produrre un punteggio elevato alla valutazione della fosfatasi alcalina leucocitaria.³

Nell'uomo, l'attività della fosfatasi alcalina è limitata ai granulociti maturi e a banda. Talvolta nei linfociti si può riscontrare una colorazione debole. Gli osteoblasti e le cellule endoteliali del midollo osseo si colorano marcatamente.

Procedura

NOTA: se si usano le vaschette di tipo Columbia, dividere i volumi dei reagenti per 5.

1. Misurare 45 ml di acqua deionizzata e regolare la temperatura a 18-26 °C.
2. Preparare la soluzione di sale di diazonio:
Aggiungere 1 ml di soluzione di nitrito di sodio a 1 ml di soluzione alcalina FRV OPPURE
Aggiungere 1 ml di soluzione di nitrito di sodio a 1 ml di soluzione alcalina FBB. Mescolare delicatamente per inversione. Lasciare riposare per 2 minuti.
3. Aggiungere la soluzione preparata nel punto 2 all'acqua deionizzata del punto 1.
4. Aggiungere 1 ml di soluzione alcalina di naftolo AS-BI alla soluzione di sale di diazonio diluito (punto 3). Mescolare bene e versare in una vaschetta tipo Coplin.
5. Portare il fissativo a base di citrato-acetone-formaldeide a temperatura ambiente (18-26 °C). Fissare i vetrini immergendoli nella soluzione fissativa per 30 secondi. Sciacquare delicatamente con acqua deionizzata per 45 secondi. Non far asciugare i vetrini.
6. Immergere i vetrini nella miscela soluzione alcalina-colorante (punto 4) e incubare a 18-26 °C per 15 minuti. Tenere i vetrini al riparo dalla luce diretta. Scartare la miscela soluzione alcalina-colorante dopo l'uso.
7. Dopo 15 minuti di incubazione, estrarre i vetrini dalla vaschetta tipo Coplin e sciacquarli per 2 minuti con acqua deionizzata. Non far asciugare i vetrini.
8. Controcolorare per 2 minuti. Se si usa la soluzione alcalina FRV, controcolorare con soluzione di ematosilina di Gill, N. 3. Se si usa la soluzione alcalina FBB, controcolorare con soluzione di rosso neutro, tamponata.
9. Sciacquare accuratamente i vetrini con acqua corrente e asciugarli all'aria.
10. Esaminare al microscopio. Se è necessario applicare vetrini coprioggetto, utilizzare solo un mezzo di montaggio acquoso.

Caratteristiche prestazionali

Metodo di valutazione

Eseguire la scansione del vetrino (900X) e selezionare un'area sottile in cui gli eritrociti a malapena si toccano. Le sedi di attività della fosfatasi appariranno come granuli blu o rossi, in funzione del colorante utilizzato. Selezionare 100 granulociti neutrofili segmentati e a banda consecutivi. Assegnare un punteggio da 0 a 4+ in funzione della quantità e dell'intensità del colorante precipitato riscontrabile all'interno del citoplasma di queste cellule. Per le caratteristiche del punteggio, consultare la Tabella 1. La somma delle valutazioni di 100 cellule dà il punteggio finale.

Tabella 1. Caratteristiche del punteggio*

Colorante azoico precipitato nel citoplasma				Sfondo del citoplasma
Valutazione per cellula	Quantità** (%)	Dimensione del granulo	Intensità della colorazione	
0+	Ness.	-	Ness.	Ness.
1+	50	Piccola	Da debole a moderata	Da incolore a rosa o blu molto pallido
2+	50-80	Piccola	Da moderata a forte	Da incolore a rosa chiaro o blu
3+	80-100	Da media a grande	Forte	Da incolore a rosa o blu
4+	100	Da media a grande	Brillante	Non visibile

* La tabella 1 illustra l'oscillazione delle osservazioni fatte da Kaplow.^{2,3}

** Percentuale del volume di citoplasma occupato dal precipitato di colorante azoico.

Per ottenere il punteggio dell'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (LAPA), moltiplicare il numero di cellule contaminate per il valore risultante dalla valutazione per singola cellula. Sommando queste cifre si ottiene il punteggio LAPA come esemplificato di seguito:

Valutazione per cellula	Punteggio contato	Punteggio LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totale	100	67

I seguenti punteggi sono stati ottenuti presso Sigma-Aldrich su 40 soggetti sani utilizzando la procedura descritta.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Valore medio di LAPA ± 1SD	76±31	94±39
Range di LAPA	44-106	55-133

L'intervallo dei punteggi riportati dai soggetti sani è ampio, da 20 a 180. Sui 40 soggetti sani in questione il range di oscillazione dei punteggi è stato il seguente:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Se i risultati osservati differiscono dai risultati attesi, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica di Sigma-Aldrich.

Caratteristiche di prestazione analitica

I risultati delle prestazioni analitiche per i test dati condotti su tutte le strutture target confermano una sensibilità, specificità e ripetibilità del 100%.

N. di cat.	Descrizione del prodotto	Target	Specificità intra-saggio	Sensibilità intra-saggio	Specificità inter-saggio	Sensibilità inter-saggio
861	Soluzione alcalina di naftolo AS-BI	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
862	Soluzione alcalina FRV	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
863	Soluzione alcalina FBB	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
914	Soluzione di nitrito di sodio	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
915	Soluzione di citrato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
GHS3	Soluzione di ematossilina di Gill, N. 3	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
N6264	Soluzione di rosso neutro, tamponata	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3

Avvertenze e pericoli

Per informazioni aggiornate su rischi, precauzioni e sicurezza, consultare la scheda dati di sicurezza e l'etichetta del prodotto.

86C:



- H290 Può essere corrosivo per i metalli.
- H302 Nocivo se ingerito.
- H315 Provoca irritazione cutanea.
- H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.
- H319 Provoca grave irritazione oculare.
- H335 Può irritare le vie respiratorie.
- H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P234 Conservare soltanto nell'imballaggio originale.

P273 Non disperdere nell'ambiente.

P280 Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

P301 + P312 IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.

P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

86R:



- H290 Può essere corrosivo per i metalli.
- H302 Nocivo se ingerito.
- H315 Provoca irritazione cutanea.
- H318 Provoca gravi lesioni oculari.

H373 Può provocare danni agli organi (reni) in caso di esposizione prolungata o ripetuta, se ingerito.

P234 Conservare soltanto nell'imballaggio originale.

P280 Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

P301 + P312 IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.

P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P314 In caso di malessere, consultare un medico.

Se durante l'utilizzo di questo dispositivo, o a seguito di questo, si è verificato un grave incidente, segnalarlo al fabbricante e/o al suo rappresentante autorizzato e alla propria autorità nazionale.

Definizioni dei simboli

Simboli da usare in conformità con la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabbricante		Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Codice del lotto
	Rappresentante autorizzato nella Comunità europea/Unione europea		Dichiarazione di conformità dell'Unione europea (definita in IVDR 2017/746)
	Data di scadenza		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Limite di temperatura		Attenzione
	Data di fabbricazione		Importatore
	Indica il rappresentante autorizzato in Svizzera		

Bibliografia

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Recapiti

Per effettuare un ordine, visitare il nostro sito web all'indirizzo [SigmaAldrich.com](https://www.SigmaAldrich.com). Per il servizio di assistenza tecnica, visitare l'apposita pagina dedicata sul nostro sito web all'indirizzo [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.SigmaAldrich.com/techservice).

Cronologia delle revisioni

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Trasferito a un nuovo modello con il marchio attuale. Specificato "per uso professionale" nelle sezioni "Uso previsto" e "Precauzioni". Modificata la sezione "Uso previsto" per allinearla alle linee guida dell'IVDR. Modificato "scheda dati di sicurezza dei materiali" in "scheda dati di sicurezza". Aggiornati i recapiti. Eliminate le istruzioni per conformarsi allo standard CLSI per la raccolta dei campioni. Sostituita l'indicazione della norma EN 980 con quella della norma EN ISO 15223-1:2021 per i simboli. Aggiunti recapiti da contattare in caso di eventi avversi. Aggiunta la cronologia delle revisioni. Aggiunta la sezione "Avvertenze e pericoli". Aggiunte le informazioni sul rappresentante in Svizzera (CH-REP).	
Rev. 6.0	2024
Corretto numero interno del documento.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

L'iniziale "M" e Sigma-Aldrich sono marchi commerciali di Merck KGaA, Darmstadt, Germania o delle sue affiliate. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi proprietari. Informazioni dettagliate sui marchi sono disponibili tramite risorse accessibili pubblicamente.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Instrucciones de uso

Kit de fosfatasa alcalina leucocitaria

Procedimiento n.º 86



Uso previsto

Los kits de fosfatasa alcalina Sigma-Aldrich están pensados como tinción histológica de uso general en laboratorios. Los reactivos de fosfatasa alcalina son exclusivamente para «uso diagnóstico in vitro» profesional. Este procedimiento manual semicuantitativo detecta la actividad fosfatasa alcalina en los leucocitos en sangre o en láminas de médula ósea humanas. La visualización histológica de la fosfatasa alcalina asociada representa una técnica única en la actualidad y es comúnmente utilizada en medicina.

En el tejido hematopoyético, la fosfatasa alcalina aparece restringida a los neutrófilos en banda y segmentados.^{1,2} Su demostración mediante captura simultánea utilizando naftoles sustituidos y sales de diazonio es, quizás, el primer ejemplo de una prueba enzimática citoquímica con importancia clínica.³

La mayoría de los procedimientos, incluidos los proporcionados por Sigma-Aldrich, emplean sales de diazonio estables. Se forman haciendo reaccionar una arilamina con nitrito de sodio en un medio ácido.⁴ El cloruro de diazonio resultante (normalmente inestable) puede tratarse entonces con compuestos como el cloruro de zinc, el sulfato de zinc o el naftaleno-1,6-disulfonato, formando sales estables. Estos estabilizadores pueden ejercer una marcada inhibición sobre algunos sistemas enzimáticos, mientras que los cloruros de diazonio son menos inhibidores.⁴ Por esta razón, Sigma-Aldrich proporciona ahora una solución estable de base Fast Red Violet LB, base Fast Blue BB y nitrito de sodio para la citoquímica de la fosfatasa ácida. Para simplificar aún más estos métodos, se incluye una solución de fosfato de naftol AS-BI.

Para realizar la prueba, las láminas de sangre fijadas se incuban a temperatura ambiente (18-26 °C) en una solución que contiene fosfato de naftol AS-BI y sal Fast Red Violet LB recién preparada o sal Fast Blue BB amortiguada a pH 9,5 con 2-amino-2-metil-1,3-propanediol (AMPD). Los sitios de actividad son rojos o azules dependiendo de la elección de la sal de diazonio. El procedimiento que incorpora el Fast Red Violet LB es similar a un método de referencia propuesto por el NCCLS.⁵

Reactivos

Solución alcalina de naftol AS-BI (N.º de cat. 861-10ML)

Fosfato de naftol AS-BI, 4 mg/ml, en amortiguador AMPD, 2 mol/l, pH 9,5. Advertencia. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede irritar las vías respiratorias. Evitar respirar vapores.

Solución alcalina FRV (N.º de cat. 862-10ML)

Base Fast Red Violet LB, 5 mg/ml, en ácido clorhídrico, 0,4 mol/l, con estabilizador. Advertencia. Nocivo en caso de ingestión.

Solución alcalina FBB (N.º de cat. 863-10ML)

Base Fast Blue BB, 5 mg/ml, C.I. 37175, en ácido clorhídrico, 0,4 mol/l, con estabilizador

Solución de nitrito de sodio (N.º de cat. 914-10ML)

Nitrito de sodio, 0,1 mol/l

Solución de citrato (N.º de cat. 915-50ML)

Ácido cítrico, 18 mmol/l, citrato de sodio, 9 mmol/l, cloruro de sodio, 12 mmol/l con tensioactivo, amortiguado a pH 3,6

Solución de hematoxilina, Gill N.º 3 (N.º de cat. GHS3-50ML)

Hematoxilina, certificada, 6,0 g/l, C.I. 75290, yodato sódico, 0,6 g/l y sulfato de aluminio, 52,8 g/l con estabilizadores. Peligro. Nocivo en caso de ingestión. Provoca lesiones oculares graves. Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

Solución de rojo neutro, amortiguada (N.º de cat. N6264-50ML)

Rojo neutro, certificado, 0,5 % p/v, C.I. 50040, en solución amortiguadora de acetato, pH 5,2. Conservante añadido.

Material especial necesario pero no suministrado

- Acetona, reactivo ACS
- Formaldehído al 37 % ACS

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar la solución alcalina de naftol AS-BI, la solución alcalina FRV, la solución alcalina FBB y la solución de nitrito de sodio en el frigorífico (2-8 °C). Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad. Almacenar la solución de citrato en el frigorífico (2-8 °C). La solución es adecuada para su uso en ausencia de crecimiento microbiano.

Conservar la solución de hematoxilina y la solución de rojo neutro a temperatura ambiente (18-26 °C). Proteger la solución de hematoxilina de la luz. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad.

Deterioro

Desechar la solución de hematoxilina si se vuelve marrón (sobreoxidación por aire) o púrpura (pérdida de acidez).

Preparación

Los reactivos se suministran listos para su uso.

Fijador de citrato-acetona-formaldehído: A 25 ml de solución de citrato, N.º de cat 915-50ML, añadir 65 ml de acetona y 8 ml de formaldehído al 37 %. Colocar en un frasco de vidrio y tapar bien. Conservar en el frigorífico (2-8 °C). Calentar a 18-26 °C antes de usar. Estable hasta 4 semanas si se almacena bien tapado en el frigorífico.

Precauciones

Estos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (DMDIV) están destinados a un uso de diagnóstico in vitro en un entorno de laboratorio clínico. Estos DMDIV están destinados a un uso profesional por parte de personal cualificado. El personal de laboratorio capacitado de Sigma-Aldrich puede utilizar los DMDIV para manipular muestras humanas que puedan ser infecciosas, utilizar microscopios y otros equipos de laboratorio y tener percepción de los colores y agudeza visual para distinguir los colores y otros objetos bajo el microscopio.

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Se deben eliminar los residuos respetando todas las normativas locales, estatales, regionales o nacionales.

Procedimiento

Recogida de la muestra

Ningún método de prueba conocido puede ofrecer total garantía de que las muestras de sangre o tejidos no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Pueden utilizarse láminas de sangre fresca o de médula ósea o muestras anticoaguladas con heparina.⁵ EVITAR EL EDTA.⁵ Los frotis de sangre deben teñirse para detectar la actividad enzimática dentro de las 8 horas siguientes a su preparación. Sin embargo, si esto no es posible, la pérdida gradual de la actividad de la fosfatasa alcalina puede retrasarse mediante la fijación y el almacenamiento durante la noche en el congelador.⁵ Las láminas deben secarse al menos 1 hora antes de la fijación y 3 horas después de la fijación antes de la congelación.

Notas

Realizar el procedimiento utilizando controles positivos. Pueden obtenerse de pacientes con leucocitosis piogénica, o de mujeres en el tercer trimestre del embarazo o durante los primeros días del puerperio. Las puntuaciones de la fosfatasa alcalina leucocitaria de estas personas suelen ser superiores a 100. Se puede preparar un control negativo a partir de un frotis normal fijado sumergiéndolo en agua hirviendo durante 1 minuto para inactivar la enzima. Las láminas de control pueden conservarse hasta 1 año si se almacenan fijadas, envueltas en Parafilm® a -70 °C. Estas láminas deben secarse al menos 1 hora antes de la fijación y 3 horas después de la fijación antes de la congelación.

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio intervalo esperado, característico para la población local.

El procedimiento depende de la valoración subjetiva de las células teñidas. Esto puede dar lugar a una amplia variación de las clasificaciones obtenidas. La temperatura de la mezcla de reacción debe mantenerse entre 18-26 °C. Las temperaturas más bajas darán lugar a puntuaciones significativamente más bajas. Por encima de los 30 °C, se produce un marcado aumento de la actividad. Los eosinófilos no se tiñen pero pueden reconocerse por sus núcleos bilobulados y los grandes gránulos refractarios.

Hay pocos datos sobre los compuestos que pueden interferir con la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria (LAPA). Se sabe que ciertos fármacos y otras sustancias influyen en la actividad de la fosfatasa alcalina circulante.⁶ Los anticonceptivos orales, el cortisol y el estrés pueden provocar un aumento de la fosfatasa alcalina leucocitaria.³

En los seres humanos, la actividad de la fosfatasa alcalina está restringida a los granulocitos maduros y cayados. Ocasionalmente puede observarse una débil tinción en los linfocitos. Los osteoblastos de la médula ósea y las células endoteliales se tiñen en gran medida.

Procedimiento

NOTA: Para usar con los frascos Columbia, dividir los volúmenes de reactivos entre 5.

1. Medir 45 ml de agua desionizada y ajustar la temperatura a 18-26 °C.
2. Preparar la solución de sal de diazonio:
Añadir 1 ml de solución de nitrito de sodio a 1 ml de solución alcalina de FRV O
Añadir 1 ml de solución de nitrito de sodio a 1 ml de solución alcalina de FBB. Mezclar por inversión suave. Dejar reposar durante 2 minutos.
3. Añadir la solución preparada en el paso 2 al agua desionizada del paso 1.
4. Añadir 1 ml de solución alcalina de naftol AS-BI a la solución de sal de diazonio diluida (Paso 3). Mezclar a fondo y verter en un frasco Coplin.
5. Llevar el fijador de citrato-acetona-formaldehído hasta la temperatura ambiente (18-26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en la solución fijadora durante 30 segundos. Aclarar suavemente en agua desionizada durante 45 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
6. Añadir los portaobjetos a la mezcla alcalina-tinte (paso 4) e incubar a 18-26 °C durante 15 minutos. Proteger los portaobjetos sumergidos de la luz directa. Desechar la mezcla alcalina-tinte después de su uso.
7. Tras 15 minutos de incubación, retirar los portaobjetos del frasco Coplin y enjuagar durante 2 minutos en agua desionizada. No dejar que los portaobjetos se sequen.
8. Hacer contratinción durante 2 minutos. Si se utiliza la solución alcalina FRV, hacer contratinción con la solución de hematoxilina, Gill n.º 3. Si se utiliza la solución alcalina FBB, hacer contratinción con la solución roja neutra, amortiguada.
9. Aclarar los portaobjetos con agua del grifo y dejar secar al aire.
10. Evaluar al microscopio. Si se requiere un cubreobjetos, utilizar únicamente un medio de montaje acuoso.

Características de funcionamiento

Método de puntuación

Examinar la lámina (900X) y seleccionar una zona fina en la que los eritrocitos apenas se toquen. Los sitios de actividad de la fosfatasa aparecerán como gránulos azules o rojos, dependiendo del colorante utilizado. Seleccionar 100 granulocitos neutrófilos consecutivos segmentados y en forma de cayado. Clasificar de 0 a 4+ en función de la cantidad e intensidad del colorante precipitado en el citoplasma de estas células. Para conocer las características de la puntuación, consultar la tabla 1. La suma de las valoraciones de 100 células se considera la puntuación.

Tabla 1. Características de la puntuación*

Tinte azoico precipitado en el citoplasma				
Clasificación de las células	Cantidad** (%)	Tamaño del gránulo	Intensidad de la tinción	Fondo del citoplasma
0+	Ninguno	-	Ninguno	Ninguno
1+	50	Pequeño	De débil a moderada	De incoloro a rosa muy pálido o azul
2+	50-80	Pequeño	De moderada a fuerte	De incoloro a rosa pálido o azul
3+	80-100	De mediano a grande	Fuerte	De incoloro a rosa o azul
4+	100	De mediano a grande	Brillante	No es visible

* La tabla 1 representa la modificación de las observaciones realizadas por Kaplow.^{2,3}

** Porcentaje del volumen del citoplasma ocupado por el precipitado de colorante azoico.

Para obtener la puntuación de la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria (LAPA), el número de células contadas se multiplica por el valor de la clasificación celular. Estas cifras se suman para obtener la puntuación LAPA como se muestra en los siguientes ejemplos:

Clasificación de las células	Puntuación contada	Puntuación LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

Las siguientes puntuaciones de 40 individuos sanos se obtuvieron en Sigma-Aldrich mediante el procedimiento descrito.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA Media ± 1SD	76±31	94±39
Intervalo LAPA	44-106	55-133

El intervalo de las puntuaciones normales es amplio, variando de 20 a 180. Se obtuvieron los siguientes intervalos de puntuación de esas 40 personas normales:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

Características de funcionamiento analítico

Los resultados del funcionamiento analítico de las pruebas realizadas en todas las estructuras objetivo confirman una sensibilidad, especificidad y repetibilidad del 100 %.

N.º de cat.	Descripción del producto	Objetivo	Especificidad intraensayo	Sensibilidad intraensayo	Especificidad interensayo	Sensibilidad interensayo
861	Solución alcalina de naftol AS-BI	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
862	Solución alcalina FRV	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
863	Solución alcalina FBB	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
914	Solución de nitrato de sodio	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
915	Solución de citrato	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
GHS3	Solución de hematoxilina, Gill n.º 3.	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
N6264	Solución de rojo neutro, amortiguada	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Advertencias y peligros

Consulte la ficha de seguridad y el etiquetado del producto para obtener información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

86C:



- H290 Puede ser corrosivo para los metales.
- H302 Nocivo en caso de ingestión.
- H315 Provoca irritación cutánea.
- H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
- H319 Provoca irritación ocular grave.
- H335 Puede irritar las vías respiratorias.
- H411 Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos duraderos.
- P234 Conservar únicamente en el embalaje original.
- P273 No dispersar en el medio ambiente.
- P280 Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

P301 + P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si la persona no se encuentra bien.

P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

86R:



- H290 Puede ser corrosivo para los metales.
- H302 Nocivo en caso de ingestión.
- H315 Provoca irritación cutánea.

H318 Provoca lesiones oculares graves.

H373 Puede provocar daños en los órganos (riñón) tras exposiciones prolongadas o repetidas en caso de ingestión.

P234 Conservar únicamente en el embalaje original.

P280 Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

P301 + P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si la persona no se encuentra bien.

P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P314 Consultar a un médico en caso de malestar.

Si durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se produce un incidente grave, informe de ello al fabricante o a su representante autorizado y a su autoridad nacional.

Definiciones de los símbolos

Símbolos definidos en la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar instrucciones de uso		Código de lote
 	Representante autorizado en la Comunidad Europea/Unión Europea		Declaración UE de conformidad (definida en el Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro)
	Fecha de caducidad		Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura		Precaución
	Fecha de fabricación		Importador
 	Indica el representante autorizado en Suiza		

Referencias

- 1. Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- 2. Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- 3. Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250
- 4. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- 5. Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- 6. Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- 7. Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Información de contacto

Para hacer un pedido, visite nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para solicitar el Servicio Técnico, visite la página de servicio técnico en nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historial de revisiones

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Transferido a la nueva plantilla con la marca actual. Especificado para uso profesional en uso previsto y precauciones. Se ha revisado el uso previsto para adaptarlo a las directrices europeas sobre DIV. Se ha actualizado la ficha de datos de seguridad del material a la ficha de datos de seguridad. Se ha actualizado la información de contacto. Se ha eliminado la instrucción de seguir el CLSI para la recogida de muestras. Se ha eliminado la norma EN 980 y se ha cambiado a la norma EN ISO 15223-1:2021 en los símbolos. Se ha añadido la información de contacto en caso de acontecimientos adversos. Se ha añadido una tabla del historial de revisiones. Se han añadido advertencias y peligros. Se ha añadido información del representante de Suiza.	
Rev. 6.0	2024
Se ha corregido el número de documento interno.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

La M inicial y Sigma-Aldrich son marcas comerciales registradas de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania o sus filiales. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños. Puede consultarse la información detallada sobre las marcas comerciales en recursos accesibles al público.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Brugsanvisning

Alkalisk fosfatase-sæt til leukocytter

Procedure nr. 86



Tilsigtet brug

Sigma-Aldrich alkalisk fosfatase-sæt er beregnet som en histologisk farvning til almindelig laboratoriebrug. Alkaline Phosphatase-reagenser er udelukkende beregnet til professionel "in vitro-diagnostisk brug". Denne manuelle, kvalitative, histokemiske procedure påviser alkalisk fosfatase-aktivitet i leukocytter i blod- eller knoglemarvsvævsfilm fra mennesker. Histologisk visualisering af leukocyt-associeret alkalisk fosfatase er en unik teknik, som aktuelt finder bred anvendelse på det medicinske område.

I hæmatopoietisk væv ser alkalisk fosfatase ud til at være begrænset til bånd- og segmenterede neutrofiler.^{1,2} Dens påvisning gennem samtidig indfangning ved brug af substituerede naphtholer og diazoniumsalte er måske det tidligste eksempel på en cytokemisk enzymtest med klinisk betydning.³

De fleste procedurer, inklusive dem, der leveres af Sigma-Aldrich, anvender stabile diazoniumsalte. Disse dannes ved at lade en arylamin reagere med natriumnitrit i et surt medium.⁴ Det resulterende diazoniumklorid (normalt ustabil) kan derefter behandles med forbindelser såsom zinkklorid, zinksulfat eller naphthalen-1,6-disulfonat, hvorved der dannes stabile salte. Disse stabilisatorer kan udøve en markant hæmning på visse enzymatiske systemer, hvorimod diazoniumkloriderne er mindre hæmmende.⁴ Af denne grund leverer Sigma-Aldrich nu stabile opløsninger af Fast Red Violet LB-base, Fast Blue BB-base og natriumnitrit til alkalisk fosfatase-cytokemi. For at forenkle disse metoder yderligere er der også inkluderet en stabil opløsning af naphthol-AS-BI-fosfat.

Testen udføres ved at inkubere fikserede blodfilm ved stuetemperatur (18-26 °C) i en opløsning indeholdende naphthol-AS-BI-fosfat og frisklavet Fast Red Violet LB-salt eller Fast Blue BB-salt, der er bufret ved pH 9,5 med 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (AMPD). Aktivitetssteder er enten røde eller blå afhængigt af valget af diazoniumsalt. Proceduren med Fast Red Violet LB ligner en foreslået NCCLS-referencemetode.⁵

Reagenser

Alkalisk naphthol-AS-BI-opløsning (kat.nr. 861-10ML)

Naphthol-AS-BI-fosfat, 4 mg/ml, i AMPD-buffer, 2 mol/l, pH 9,5. Advarsel. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Kan forårsage irritation af luftvejene. Undgå indånding af dampe.

Alkalisk FRV-opløsning (kat.nr. 862-10ML)

Fast Red Violet LB-base, 5 mg/ml, i saltsyre, 0,4 mol/l, med stabilisator. Advarsel. Farlig ved indtagelse.

Alkalisk FBB-opløsning (kat.nr. 863-10ML)

Hurtig blå BB-base, 5 mg/ml, C.I. 37175, i saltsyre, 0,4 mol/l, med stabilisator

Natriumnitritopløsning (kat.nr. 914-10ML)

Natriumnitrit, 0,1 mol/l.

Citratopløsning (kat.nr. 915-50ML)

Citronsyre, 18 mmol/l, natriumcitrat, 9 mmol/l, natriumchlorid, 12 mmol/l med overfladeaktivt stof, bufret ved pH 3,6.

Hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3 (kat.nr. GHS3-50ML)

Hæmatoxylin, certificeret, 6,0 g/l, C.I. 75290, natriumiodid, 0,6 g/l og aluminiumsulfat, 52,8 g/l, med stabilisatorer. Fare. Farlig ved indtagelse. Forårsager alvorlig øjenskade. Bær beskyttelseshandsker/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

Neutral rød-opløsning, bufret (kat.nr. N6264-50ML)

Neutral rød, certificeret, 0,5 % w/v, C.I. 50040, i acetatbuffer, pH 5,2. Tilsat konserveringsmiddel.

Særlige materialer, som er påkrævede, men ikke medfølger

- Acetone, ACS-reagens
- Formaldehyd, 37 % ACS

Opbevaring og stabilitet

Opbevar alkalisk naphthol-AS-BI-opløsning, alkalisk FRV-opløsning, alkalisk FBB-opløsning og natriumnitritopløsning i køleskab (2-8 °C). Reagenserne er stabile indtil udløbsdatoen. Opbevar citratopløsning i køleskab (2-8 °C). Opløsningen er egnet til brug ved fravær af mikrobiel vækst.

Opbevar hæmatoxylinopløsning og neutral rød-opløsning ved stuetemperatur (18-26 °C). Beskyt hæmatoxylinopløsning mod lys. Reagenserne er stabile indtil udløbsdatoen.

Forringelse

Hæmatoxylinopløsning skal kasseres, hvis den bliver brun (overoxideret på grund af luft) eller lilla (tab af surhed).

Klargøring

Reagenserne leveres klar til brug.

Citrat-acetone-formaldehydfiksativ: Tilsæt 65 ml acetone og 8 ml 37 % formaldehyd til 25 ml citratopløsning, kat.nr. 915-50ML. Anbring i en glasflaske, og stram låget godt til. Opbevares i køleskab (2-8 °C). Opvarm til 18-26 °C før brug. Stabil i op til 4 uger ved tæt tillukket opbevaring i køleskab.

Forsigtighedsregler

Disse IVD'er er beregnet til in vitro-diagnostisk brug i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD'er er udelukkende beregnet til kvalificeret personales professionelle brug. IVD'er fra Sigma-Aldrich kan benyttes af laboratoriepersonale, som er uddannet til at håndtere potentielt smittefarlige humane prøver, bruge mikroskoper og andet laboratorieudstyr og har en farveopfattelse og synsstyrke, som gør dem i stand til at skelne mellem farver og andre genstande under et mikroskop.

Normale forsigtighedsregler, der iagttages ved håndtering af laboratoriereagenser, skal følges. Bortskaf affald under overholdelse af alle lokale, regionale eller nationale regler.

Procedure

Prøveindsamling

Ingen kendt testmetode kan give fuldstændig sikkerhed for, at blodprøver eller væv ikke overfører smitte. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver betragtes som potentielt smittefarlige.

Friske blod- eller knoglemarvsvævsfilm eller prøver, som er antikoaguleret med heparin, kan bruges.⁵ UNDGÅ EDTA.⁵ Blodudstrygninger skal farves for enzymaktivitet inden for 8 timer efter klargøring. Hvis dette ikke er muligt, kan gradvist tab af alkalisk fosfataseaktivitet dog forsinkes ved fiksering og opbevaring natten over i fryseren.⁵ Film skal tørres mindst 1 time før fiksering og 3 timer efter fiksering inden frysning.

Bemærkninger

Udfør proceduren ved brug af positive kontroller. Disse kan fås fra patienter med pyogen leukocytose eller kvinder i tredje trimester af graviditeten eller i løbet af de første adskillige dage efter fødslen. Scoren for alkalisk fosfatase i leukocytter fra disse personer overstiger normalt 100. En negativ kontrol kan fremstilles ud fra en normal fikseret udstrygning ved at nedsænke den i kogende vand i 1 minut for at inaktivere enzymet. Kontrolfilm kan bevares i op til 1 år, hvis de opbevares fikseret og indpakket i Parafilm® ved -70°C. Disse film bør være tørret mindst 1 time før fiksering og 3 timer efter fiksering, før de fryses.

Det anbefales kraftigt, at hvert laboratorium etablerer sit eget forventede område, der er karakteristisk for den lokale population.

Proceduren afhænger af subjektiv vurdering af farvede celler. Dette kan resultere i en bred variation af opnåede vurderinger. Temperaturen i reaktionsblandingen skal holdes mellem 18 og 26 °C. Lavere temperaturer vil resultere i betydeligt lavere scorer. Over 30 °C vil der forekomme markante stigninger i aktiviteten. Eosinofiler farves ikke, men kan genkendes på tofligede kerner og store refraktile granula.

Der er mangel på data vedrørende stoffer, der kan interferere med alkalisk fosfatase i leukocytter (LAPA). Visse lægemidler og andre stoffer er kendt for at påvirke cirkulerende alkalisk fosfataseaktivitet.⁶ Orale præventionsmidler, cortisol og stress kan resultere i forhøjede scorer for alkalisk fosfatase i leukocytter.⁷

Hos mennesker er alkalisk fosfataseaktivitet begrænset til modne og båndformede granulocytter. Der kan lejlighedsvist observeres svag farvning i lymfocytter. Knoglemarvs-osteoblaster og endotelceller farves kraftigt.

Procedure

- BEMÆRK:** Når der anvendes Columbia-skåle, skal reagensvolumenen divideres med 5.
1. Opmål 45 ml demineraliseret vand, og juster temperaturen til 18-26 °C.
 2. Forbered en diazoniumsaltopløsning:
Tilsæt 1 ml natriumnitritopløsning til 1 ml alkalisk FRV-opløsning, ELLER tilsæt 1ml natriumnitritopløsning til 1 ml alkalisk FBB-opløsning. Bland ved forsigtig inversion. Lad opløsningen stå i 2 minutter.
 3. Tilsæt opløsningen, der blev fremstillet i trin 2, til det demineraliserede vand fra trin 1.
 4. Tilsæt 1 ml alkalisk naphthol-AS-BI-opløsning til fortyndet diazoniumsaltopløsning (trin 3). Bland opløsningen grundigt, og hæld den i en Coplin-skål.
 5. Bring citrat-acetone-formaldehydfiksativet op på stuetemperatur (18-26 °C). Fikser objektglassene ved at nedsænke dem i fiksativopløsning i 30 sekunder. Skyl forsigtigt i demineraliseret vand i 45 sekunder. Lad ikke objektglassene tørre.
 6. Anbring objektglassene i den alkaliske farvestofblanding (trin 4), og inkuber ved 18-26 °C i 15 minutter. Beskyt de nedsænkede objektglas mod direkte lys. Bortskaf den alkaliske farvestofblanding efter brug.
 7. Efter 15 minutters inkubation fjernes objektglassene fra Coplin-skålen og skylles i 2 minutter i demineraliseret vand. Lad ikke objektglassene tørre.
 8. Kontrastfarv i 2 minutter. Hvis der bruges alkalisk FRV-opløsning, skal der kontrastfarves med hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3. Hvis der bruges alkalisk FBB-opløsning, skal der kontrastfarves med bufret neutral rød-opløsning.
 9. Skyl objektglassene grundigt i postevand, og lad dem lufttørre.
 10. Evaluer mikroskopisk. Brug udelukkende vandige monteringsmedier, hvis dækglasser er påkrævet.

Præstationskarakteristika

Scoringsmetode

Scan filmen (900X), og vælg et tyndt område, hvor erythrocytterne næsten ikke rører hinanden. Steder med fosfataseaktivitet vil fremstå som blå eller røde granula afhængigt af det anvendte farvestof. Vælg 100 på hinanden følgende segmenterede og båndformede neutrofile granulocytter. Klassificer fra 0 til 4+ på basis af mængden og intensiteten af udfældet farvestof i cytoplasmaet i disse celler. Se tabel 1 vedrørende karakteristika for scoring. Summen af klassificeringen af 100 celler betragtes som scoren.

Tabel 1. Karakteristika for scoring*

Udfældet azofarvestof i cytoplasma				
Celleklassificering	Mængde** (%)	Granulumstørrelse	Farvningsintensitet	Baggrund for cytoplasma
0+	Ingen	-	Ingen	Ingen
1+	50	Lille	Svag til moderat	Farveløs til meget blegt lyserød eller blå
2+	50-80	Lille	Moderat til kraftig	Farveløs til blegt lyserød eller blå
3+	80-100	Mellem til stor	Kraftig	Farveløs til lyserød eller blå
4+	100	Mellem til stor	Strålende	Ikke synlig

* Tabel 1 repræsenterer ændring af observationer foretaget af Kaplow.^{2,3}

** Procent af cytoplasmavolumen, der er optaget af azofarveudfældning.

Scoren for alkalisk fosfataseaktivitet i leukocytter (LAPA) opnås ved at multiplicere antallet af talte celler med værdien for cellemeklassificering. Disse tal lægges sammen for at opnå LAPA-scoren som vist i følgende eksempler:

Celleklassificering	Optalt score	LAPA-score
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
I alt	100	67

Følgende score fra 40 raske personer blev opnået hos Sigma-Aldrich ved brug af den beskrevne procedure.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA-middelværdi ±1 SD	76±31	94±39
LAPA-område	44-106	55-133

Området for normale scorer er bredt og ligger fra 20 til 180. Følgende scoringsområder blev opnået fra disse 40 normale personer:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Kontakt Sigma-Aldrichs tekniske service for at få hjælp, hvis de observerede resultater afviger fra de forventede resultater.

Analytiske præstationskarakteristika

Resultaterne for analyseydelsen for de givne tests, som blev udført på alle målstrukturer, bekræfter 100 % sensitivitet, specificitet og repetérbarhed.

Kat. nr.	Produktbeskrivelse	Mål	Specificitet inden for analyse	Sensitivitet inden for analyse	Specificitet mellem analyser	Sensitivitet mellem analyser
861	Alkalisk naphthol-AS-BI-opløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
862	Alkalisk FRV-opløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
863	Alkalisk FBB-opløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
914	Natriumnitritopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
915	Citratopløsning	Aktivitetssteder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
GHS3	Hæmatoxylinopløsning, Gill nr. 3	Kerner	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
N6264	Neutral rød-opløsning, bufret	Kerner	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3

Advarsler og farer

Se sikkerhedsdatabladet og produktmærkningen vedrørende opdaterede risiko-, fare- eller sikkerhedsoplysninger.

86C:



- H290 Kan ætse metaller.
- H302 Farlig ved indtagelse.
- H315 Forårsager hudirritation.
- H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion.
- H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.
- H335 Kan forårsage irritation af luftvejene.
- H411 Giftig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.
- P234 Opbevares kun i originalemballagen.
- P273 Undgå udledning til miljøet.
- P280 Bær beskyttelseshandsker/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
- P301 + P312 I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Kontakt GIFTLINJEN/en læge i tilfælde af ubehag.
- P302 + P352 VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand.
- P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis de er til stede og er lette at fjerne. Fortsæt med at skylle.

86R:



- H290 Kan ætse metaller.
- H302 Farlig ved indtagelse.
- H315 Forårsager hudirritation.
- H318 Forårsager alvorlig øjenskade.
- H373 Kan forårsage organskader (nyrer) ved længerevarende eller gentagen eksponering ved indtagelse.
- P234 Opbevares kun i originalemballagen.
- P280 Bær beskyttelseshandsker/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

P301 + P312 I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Kontakt GIFTLINJEN/en læge i tilfælde af ubehag.

P302 + P352 VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis de er til stede og er lette at fjerne. Fortsæt med at skylle.

P314 Søg lægehjælp ved ubehag.

Hvis der er opstået en alvorlig hændelse under brugen af denne enhed eller som følge af dens brug, skal det indberettes til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og til den nationale myndighed i brugerens land.

Symboldefinitioner

Symboler som defineret i EN ISO 15223-1:2021

	Producent		Katalognummer
	Se brugsanvisningen		Batchkode
	Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/Den Europæiske Union		Den Europæiske Unions overensstemmelseserklæring (defineret i IVDR 2017/746)
	Sidste anvendelsesdato		Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Temperaturgrænse		Forsigtig
	Fremstillingsdato		Importør
	Angiver den autoriserede repræsentant i Schweiz		

Referencer

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Kontaktoplysninger

Besøg vores websted på SigmaAldrich.com for at afgive en bestilling. Gå til siden for teknisk service på vores websted på SigmaAldrich.com/techservice for at få oplysninger om teknisk service.

Revisionshistorik

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Overført til ny skabelon med nuværende branding. Specificeret til professionel brug under tilsigtet brug og forsigtighedsregler. Revideret tilsigtet brug for at stemme overens med IVDR-retningslinjer. Opdateret materialesikkerhedsdatablad til sikkerhedsdatablad. Opdateret kontaktoplysninger. Fjernet instruks om at følge CLSI vedrørende prøveindsamling. Fjernet EN 980 og ændret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. Tilføjet kontaktoplysninger i tilfælde af uønskede hændelser. Tilføjet en revisionshistoriktabel. Tilføjet advarsler og farer. Tilføjet CH-REP-oplysninger.	
Rev. 6.0	2024
Rettet internt dokumentnummer.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Forbogstavet M og Sigma-Aldrich er varemærker tilhørende Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller deres tilknyttede virksomheder. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere. Detaljerede oplysninger om varemærker kan indhentes via offentligt tilgængelige ressourcer.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Bruksanvisning

Leukocyt-alkalisk fosfatas-sats

Förfarande nr. 86



Avsedd användning

Sigma-Aldrich alkaliska fosfatas-satser är avsedda som histologisk färgning för allmän laboratorieanvändning. Alkaliska fosfatas-reagenser är endast avsedda för professionell "in vitro"-diagnostisk användning". Det här manuella, kvalitativa och histokemiska förfarandet påvisar alkalisk fosfatas-aktivitet i leukocyter i blod- eller benmärgsfilmer från människor. Histologisk visualisering av leukocyt associerad med alkalisk fosfatas är en unik teknik som för närvarande ofta används inom medicinska områden.

I hematopoetisk vävnad verkar alkaliskt fosfatas begränsat till bandformade och segmenterade neutrofiler.^{1,2} Dess påvisning genom samtidig infångning med hjälp av substituerade naftoler och diazoniumsalter är kanske det tidigaste exemplet på ett cytochemiskt enzymtest med klinisk betydelse.³

De flesta förfaranden, inklusive de som tillhandahålls av Sigma-Aldrich, använder stabila diazoniumsalter. Dessa bildas genom att reagera en arylamin med natriumnitrit i ett surt medium.⁴ Den resulterande diazoniumkloriden (vanligtvis instabil) kan sedan behandlas med föreningar som zinkklorid, zinksulfat eller naftalen-1,6- disulfonat, vilket bildar stabila salter. Dessa stabilisatorer kan utöva markant hämning på vissa enzymsystem, medan diazoniumkloriderna är mindre hämmande.⁴ Av denna anledning tillhandahåller Sigma-Aldrich nu stabila lösningar av Red Violet LB-bas, Fast Blue BB-bas och natriumnitrit för cytokemi med alkaliskt fosfatas. För att ytterligare förenkla dessa metoder ingår en stabil lösning av naftol-AS-BI-fosfat.

För att utföra testet inkuberas fixerade blodfilmer i rumstemperatur (18–26 °C) i en lösning innehållande naftol-AS-BI-fosfatas och nyligen beredd Fast Red Violet-LB-salt och Fast Blue BB-salt buffrat vid pH 9,5 med 2-amino-2-metyl-1,3-propanediol (AMPD). Aktivitetställen är antingen röda eller blåa beroende av valet av diazoniumsalt. Förfarandet som använder Fast Red Violet LB liknar en föreslagen NCCLS-referensmetod.⁵

Reagenser

Naftol AS-BI alkalisk lösning (kat.-nr. 861-10ML)

Naftol-AS-BI-fosfatas, 4 mg/ml, i AMPD-buffert, 2 mol/l, pH 9,5. Varning. Orsakar hudirritation. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan orsaka irritation i luftvägarna. Undvik att andas in ångor.

FRV-alkalisk lösning (kat.-nr. 862-10ML)

Fast Red Violet LB-bas, 5 mg/ml, i saltsyra, 0,4 mol/l, med stabiliseringsmedel. Varning. Skadligt vid förtäring.

FBB-alkalisk lösning (kat.-nr. 863-10ML)

Fast Blue BB-bas, 5 mg/ml, C.I. 37175, i saltsyra, 0,4 mol/l, med stabiliseringsmedel.

Natriumnitritlösning (kat.-nr. 914-10ML)

Natriumnitrit, 0,1 mol/l

Citratlösning (kat.-nr. 915-50ML)

Citronsyra, 18 mmol/l, natriumcitrat, 9 mmol/l, natriumklorid, 12 mmol/l med ytaktivt ämne, buffrat vid pH 3,6

Hematoxylinlösning, Gill nr. 3 (kat.-nr. GHS3-50ML)

Hematoxylin, certifierad, 6,0 g/l, C.I. 75290, natriumjodat, 0,6 g/l, och aluminiumsulfat, 52,8 g/l med stabiliseringsmedel. Fara. Skadligt vid förtäring. Orsakar allvarliga ögonskador. Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

Neutral röd lösning, buffrad (kat.-nr. N6264-50ML)

Neutral röd, certifierad, 0,5 % w/v, C.I. 50040, i acetatbuffert, pH 5,2. Konserveringsmedel tillagt.

Särskilt materiel som krävs men inte tillhandahålls

- Aceton, ACS-reagens
- Formaldehyd, 37 % ACS

Förvaring och hållbarhet

Förvara naftol-AS-BI-alkalisk lösning, FRV-alkalisk lösning, FBB-alkalisk lösning och natriumnitritlösning i kylskåp (2–8 °C). Reagensen är stabil fram till utgångsdatumet. Förvara citratlösning i kylskåp (2–8 °C). Lösningen är lämplig för användning i frånvaro av mikrobiell tillväxt.

Förvara hematoxylinlösningen och neutral röd lösning i rumstemperatur (18–26 °C). Skydda hematoxylinlösning från ljus. Reagensen är stabil fram till utgångsdatumet.

Försämring

Kassera hematoxylinlösningen om den blir brun (överoxiderad av luft) eller lila (minskad surhet).

Beredning

Reagenser tillhandahålls redo att användas.

Citratacetonaldehydfixeringsmedel: Tillsätt 65 ml aceton och 8 ml formaldehyd (37 %) till 25 ml citratlösning, kat.-nr. 915-50ML. Häll i glasflaska och tillslut tätt. Förvaras i kylskåp (2–8 °C). Värm till 18–26 °C före användning. Stabil i upp till fyra veckor om den förvaras med tätt lock i kylskåp.

Försiktighetsåtgärder

Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är avsedda att användas i klinisk laboratoriemiljö. Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är endast avsedda att

användas av kvalificerad personal. Medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik från Sigma-Aldrich får användas av laboratoriepersonal som är utbildad i hantering av humanprover som kan vara smittsamma, användning av mikroskop och annan laboratorieutrustning samt har tillräckligt bra färgseende och synskärpa för att kunna urskilja färger och andra föremål under mikroskop.

Följ sedvanliga försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser. Kassera avfall i enlighet med alla lokala, statliga, regionala och nationella bestämmelser.

Förfarande

Provtagning

Inga kända testmetoder kan erbjuda fullständig garanti för att inte smitta överförs genom blodprover eller vävnad. Därför måste alla blodderivat och vävnadsprover betraktas som potentiellt smittsamma.

Nytagna blod- eller benmärgsfilmer eller prover som antikoagulerats med heparin kan användas.⁵ UNDIK EDTA.⁵ Blodutstryk bör färgas för enzymaktivitet inom 8 timmar efter preparering. Om detta inte är möjligt kan gradvis förlust av aktivitet av alkalisk fosfatas fördröjas genom fixering och förvaring över natten i frys.⁵ Filmer bör torka minst en timme före fixering och 3 timmar efter fixering innan de fryses.

Anmärkningar

Utför förfarandet med positiva kontroller. Dessa kan insamlas från patienter med pyrogenisk leukocyter och kvinnor i graviditetens tredje trimester eller under de första dagarna efter förlösningen. Värdet för alkalisk fosfatas i leukocyter från dessa personer är vanligtvis över 100. En negativ kontroll kan prepareras från ett normalt fixerat utstryk genom att sänka ned det i kokande vatten i 1 minut för att avaktivera enzymet. Kontrollfilmer kan bevaras i upp till 1 år om de förvaras fixerade, inlindade i Parafilm® vid –70 °C. Dessa filmer bör torkas minst 1 timme före fixering och 3 timmar efter fixering innan de fryses.

Det rekommenderas starkt att varje labb etablerar sitt eget förväntade intervall, karakteristiskt för den lokala befolkningen.

Förfarandet är beroende av subjektiv bedömning av färgade celler. Detta kan resultera i stor variation bland de bedömningar som görs. Temperaturen på reaktionsblandningen måste hållas mellan 18 och 26 °C. Lägre temperaturer kommer leda till väsentligt lägre värden. Över 30 °C kommer en markant ökning i aktivitet att ske. Eosinofiler färgas inte men kan kännas igen på sina biloberade kärnor och stora refraktila granula.

Det finns brist på data gällande föreningar som kan störa aktiviteten av alkaliskt fosfatas i leukocyter (LAPA). Vissa läkemedel och andra substanser är kända för att påverka aktivitet av cirkulerat alkaliskt fosfatas.⁶ Orala preventivmedel, kortisol och stress kan resultera i förhöjda värden av alkalisk fosfatas i leukocyter.³

I människor är alkalisk fosfatasaktivitet begränsad till mogna och bandformiga granulocyter. Sporadisk svag färgning kan observeras i lymfocyter. Benmärgsosteoblaster och endotelceller färgas starkt.

Förfarande

OBS! För användning med Columbia-burkar ska du dela reagensvolymerna med 5.

1. Mät upp 45 ml avjoniserat vatten och justera temperaturen till 18–26 °C.
2. Bered diazoniumsaltlösning:
Lägg till 1 ml natriumnitritlösning till 1 ml FRV-alkalisk lösning
ELLER
Lägg till 1 ml natriumnitritlösning till 1 ml FBB-alkalisk lösning. Blanda genom att vända försiktigt. Låt stå i 2 minuter.
3. Lägg till lösningen som beredd i steg 2 i det avjoniserade vattnet från steg 1.
4. Lägg till 1 ml naftol-AS-BI alkalisk lösning i utspädd diazoniumsaltlösning (steg 3). Blanda väl och häll i en Coplin-burk.
5. Få citratacetonaldehydfixeringsmedlet till rumstemperatur (18–26 °C). Fixera objektglaset genom att doppa i fixeringslösning i 30 sekunder. Skölj försiktigt i avjoniserat vatten i 45 sekunder. Låt inte objektglaset torka.
6. Lägg till objektglas till den alkaliska färgämnesblandningen (steg 4) och inkubera vid 18–26 °C i 15 minuter. Skydda nedsänkta objektglas från direkt ljus. Kassera alkalisk färgämnesblandning efter användning.
7. Efter 15 minuters inkubation ska du ta ut objektglas ur Coplin-burken och skölja i 2 minuter i avjoniserat vatten. Låt inte objektglaset torka.
8. Motfärga i 2 minuter. Om FRV-alkalisk lösning används ska du motfärga med hematoxylinlösning, Gill nr. 3. Om FBB-alkalisk lösning används ska du motfärga med neutral röd lösning, buffrad.
9. Skölj objektglas noggrant i kranvatten och lufttorka.
10. Utvärdera mikroskopiskt. Om täckglas behövs ska endast ett vattenbaserat monteringsmedium användas.

Prestandaegenskaper

Värderingsmetod

Skanna filmen (900X) och välj ett tunt område där erythrocyter knappt rör varandra. Ställen med fosfatasaktivitet kommer synas som blå eller röda granula, beroende på vilket färgmedel som används. Välj 100 segment i följd och bandcellsneutrofila granulocyter. Bedöm från 0 till 4+ baserat på kvantitet och intensitet av utfällt färgämne inom cellernas cytoplasma. För egenskaper för värdebestämmande ska du se tabell 1. Summan av bedömningarna från 100 celler anses vara värdet.

Tabell 1. Egenskaper för värdebestämmande*

Utfällt azofärgämne i cytoplasma				
Cellbedömning	Mängd** (%)	Storlek på granula	Färgningsintensitet	Bakgrund av cytoplasma
0+	Ingen	-	Ingen	Ingen
1+	50	Liten	Svag till medel	Färglös till mycket blekt rosa eller blå
2+	50–80	Liten	Medel till stark	Färglös till blekt rosa eller blå
3+	80–100	Medium till stor	Stark	Färglös till rosa eller blå
4+	100	Medium till stor	Mycket stark	Ej synlig

* Tabell 1 visar modifieringar av observationer gjorda av Kaplow.^{2,3}

** Procent av volymen cytoplasma som upptas av azofärgämnesutfällning.

För att få ett värde för alkalisk fosfatasaktivitet i leukocyter (LAPA) multipliceras det räknade antalet celler med värdet för cellbedömning. Dessa siffror läggs till för att få LAPA-värdet som visas i följande exempel:

Cellbedömning	Räknat värde	LAPA-värde
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totalt	100	67

Följande värden från 40 friska individer erhöles av Sigma-Aldrich genom det beskrivna förfarandet.

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA Medelvärde ± 1SD	76±31 94±39
LAPA-intervall	44–106 55–133

Intervallen av normala värden är vid och varierar från 20 till 180. Följande värden erhöles från de 40 normala individerna:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20–146	25–180

Kontakta teknisk service på Sigma-Aldrich för hjälp ifall resultaten som observeras avviker från de förväntade resultaten.

Analytiska prestandaegenskaper

De analytiska prestandaresultaten för de givna testerna utförda på alla målstrukturer bekräftar 100 % sensitivitet, specificitet och repeterbarhet.

Kat.-nr.	Produktbeskrivning	Mål	Specificitet inom analys	Sensitivitet inom analys	Specificitet mellan analyser	Sensitivitet mellan analyser
861	Naftol-AS-BI alkalisk lösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
862	FRV-alkalisk lösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
863	FBF-alkalisk lösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
914	Natriumnitritlösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
915	Citratlösning	Aktivitetsställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
GHS3	Hematoxylinlösning, Gill nr. 3	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
N6264	Neutral röd lösning, buffrad	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Varningar och faror

Se säkerhetsdatabladet och produktmärkningen för uppdaterad information om risker, fara och säkerhet.

86C:



- H290 Kan vara frätande på metaller.
- H302 Skadligt vid förtäring.
- H315 Orsakar hudirritation.
- H317 Kan orsaka en allergisk hudreaktion.
- H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.
- H335 Kan orsaka irritation i luftvägarna.
- H411 Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.
- P234 Förvara endast i originalförpackningen.
- P273 Undvik utsläpp i miljön.
- P280 Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.
- P301 + P312 VID FÖRTÄRING: Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare om du mår dåligt.
- P302 + P352 VID KONTAKT MED HUDEN: Tvätta med mycket vatten.
- P305 + P351 + P338 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

86R:



- H290 Kan vara frätande på metaller.
- H302 Skadligt vid förtäring.
- H315 Orsakar hudirritation.
- H318 Orsakar allvarliga ögonskador.
- H373 Kan orsaka skador på organ (njurar) genom långvarig eller upprepad exponering vid förtäring.
- P234 Förvara endast i originalförpackningen.
- P280 Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.
- P301 + P312 VID FÖRTÄRING: Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare om du mår dåligt.

- P302 + P352 VID KONTAKT MED HUDEN: Tvätta med mycket vatten.
- P305 + P351 + P338 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
- P314 Sök läkarhjälp vid obehag.

Om det har inträffat ett allvarligt tillbud medan denna enhet använts eller som ett resultat av att den har använts ska det rapporteras till tillverkaren och/eller dess auktoriserade representant samt myndigheten i ditt land.

Symbolförklaring

Symboler enligt definition i EN ISO 15223-1:2021

	Tillverkare		Katalognummer
	Se bruksanvisningen		Batchkod
	Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen/ Europeiska unionen		EU-försäkran om överensstämmelse (definieras i IVDR 2017/746)
	Utgångsdatum		Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	Temperaturgräns		Försiktighet
	Tillverkningsdatum		Importör
	Anger den auktoriserade representanten Schweiz		

Referenser

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, sid. 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, Nr. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Kontaktuppgifter

För att göra en beställning besöker du vår webbplats på [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). För teknisk service besöker du sidan för teknisk service på vår webbplats [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorik

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
	Överfört till ny mall med nuvarande varumärke. Specificerat "För yrkesmässigt bruk" under "Användningsområde" och under "Försiktighetsåtgärder". Reviderat "Avsedd användning" så att det motsvarar riktlinjerna för IVDR. Uppdaterat "Materialsäkerhetsdatablad" till "Säkerhetsdatablad". Uppdaterat kontaktuppgifterna. Tagit bort anvisningen om att CLSI ska följas vid provtagning. Tagit bort EN 980 och ändrat till EN ISO 15223-1:2021 för symbolerna. Lagt till kontaktuppgifter för negativa händelser. Lagt till en tabell över revisionshistoriken. Lagt till varningar och faror. Lagt till information om representant i Schweiz.
Rev. 6.0	2024
	Rättat internt dokumentnummer.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M och Sigma-Aldrich är varumärken som tillhör Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dess dotterbolag. Övriga varumärken tillhör respektive ägare. Detaljerad information om varumärken finns tillgänglig via allmänt tillgängliga resurser.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Instruções de utilização

Kit de Fosfatase alcalina de leucócitos

Procedimento N.º 86



Utilização prevista

Os kits de fosfatase alcalina da Sigma-Aldrich destinam-se a ser utilizados como corantes histológicos para uso geral em laboratório. Os reagentes de fosfatase alcalina destinam-se somente a "Utilização para diagnóstico in vitro" por profissionais. Este procedimento histoquímico, qualitativo e manual destina-se a demonstrar atividade de fosfatase alcalina em leucócitos de sangue humano ou películas de medula óssea. A visualização histológica da fosfatase alcalina leucocitária é uma técnica única atualmente utilizada em medicina.

Em tecido hematopoiética, a fosfatase alcalina surge restrita a neutrófilos em banda e segmentados.^{1,2} A sua demonstração por captura simultânea utilizando naftóis substituídos e sais de diazônio é, talvez, o exemplo mais antigo de um teste enzimático citoquímico com significado clínico.³

A maioria dos procedimentos, incluindo os fornecidos pela Sigma-Aldrich, emprega sais de diazônio estáveis. Estes são formados pela reação de uma arilamina com nitrito de sódio num meio ácido.⁴ O cloreto de diazônio resultante (geralmente instável) pode ser então tratado com compostos, tais como cloreto de zinco, sulfato de zinco ou naftaleno-1,6-dissulfonato, formando sais estáveis. Estes estabilizadores podem exercer uma inibição acentuada em alguns sistemas enzimáticos, ao passo que os cloretos de diazônio são menos inibitórios.⁴ Por este motivo, a Sigma-Aldrich fornece agora soluções estáveis de Base vermelha violeta rápida LB, Base azul rápida BB e Nitrito de sódio para citoquímica de fosfatase alcalina. Para simplificar ainda mais estes métodos, é incluída uma solução estável de Fosfato de Naftol AS-BI.

Para realizar o teste, as películas de sangue fixadas são incubadas à temperatura ambiente (18–26 °C) numa solução contendo Fosfato de Naftol AS-BI e Sal vermelho violeta rápido LB ou Sal azul rápido BB preparado recentemente, tamponado a pH 9,5 com 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD). Os locais de atividade ou são vermelhos ou azuis, dependendo do sal diazônio selecionado. O procedimento que incorpora o Vermelho violeta rápido LB é semelhante a um método de referência proposto pelo NCCLS.⁵

Reagentes

Solução alcalina de Naftol AS-BI (N.º de cat. 861-10ML)

Fosfato de Naftol AS-BI, 4 mg/ml, em tampão de AMPD, 2 mol/l, pH 9,5. Aviso. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Evitar respirar os vapores.

Solução alcalina – FRV (N.º de cat. 862-10ML)

Base vermelha violeta rápida LB, 5 mg/ml, em ácido clorídrico, 0,4 mol/l, com estabilizador. Aviso. Nocivo por ingestão.

Solução alcalina – FBB (N.º de cat. 863-10ML)

Base azul rápida BB, 5 mg/ml, C.I. 37175, em ácido clorídrico, 0,4 mol/L, com estabilizador

Solução de Nitrito de sódio (N.º de cat. 914-10ML)

Nitrito de sódio, 0,1 mol/l

Solução de Citrato (N.º de cat. 915-50ML)

Ácido cítrico, 18 mmol/l, citrato de sódio, 9 mmol/l, cloreto de sódio, 12 mmol/l com tensoativo, tamponado a pH de 3,6

Solução de Hematoxilina, Gill N.º 3 (N.º de cat. GHS3-50ML)

Hematoxilina, certificada, 6,0 g/l, C.I. 75290, iodato de sódio, 0,6 g/l e sulfato de alumínio, 52,8 g/l, com estabilizadores. Perigo. Nocivo por ingestão. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Solução neutra vermelha, Tamponada (N.º de cat. N6264-50ML)

Vermelho neutro, certificado, 0,5% p/v, C.I. 50040, em tampão de acetato, pH 5,2. Conservante adicionado.

Materiais especiais necessários mas não fornecidos

- Acetona, Reagente ACS
- Formaldeído, 37%, ACS

Conservação e estabilidade

Conservar a Solução alcalina de Naftol AS-BI, a Solução alcalina - FRV, a Solução alcalina - FBB e a Solução de Nitrito de sódio no frigorífico (2–8 °C). Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade. Conservar a Solução de Citrato no frigorífico (2–8 °C). A Solução é adequada para uso na ausência de crescimento microbiano.

Conservar a Solução de Hematoxilina e a Solução neutra vermelha à temperatura ambiente (18–26 °C). Proteger a Solução de Hematoxilina da luz. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade.

Deterioração

Eliminar a Solução de Hematoxilina se a solução ficar castanha (excesso de oxidação devido ao ar) ou roxa (perda de acidez).

Preparação

Os reagentes são fornecidos prontos a utilizar.

Fixador de citrato-acetona-formaldeído: A 25 ml de Solução de citrato, N.º de cat. 915-50ML, adicionar 65 ml de Acetona e 8 ml de Formaldeído a 37%. Colocar em frasco de vidro e tapan firmemente. Conservar no frigorífico (2–8 °C). Aquecer até 18–26 °C antes de utilizar. Estável durante até 4 semanas se conservado firmemente tapado no frigorífico.

Precauções

Estes DIV destinam-se a utilização para diagnóstico in vitro num ambiente de laboratório clínico. Estes DIV destinam-se apenas a utilização profissional por pessoal qualificado. Os DIV da Sigma-Aldrich podem ser utilizados por técnicos de laboratório com formação no manuseamento de amostras humanas potencialmente infecciosas e na utilização de microscópios e outros equipamentos laboratoriais e com perceção cromática e acuidade visual para distinguir cores e outros objetos ao microscópio.

Devem seguir-se as precauções normais no manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos cumprindo todos os regulamentos locais, estatais, municipais ou nacionais.

Procedimento

Colheita de amostras

Nenhum método de testagem conhecido pode oferecer uma garantia total de que as amostras sanguíneas ou tecido não transmitirão infeções. Por conseguinte, todos os derivados de sangue ou amostras de tecido devem ser considerados potencialmente infecciosos.

Pode utilizar películas de sangue fresco ou medula óssea ou amostras anticoaguladas com heparina.⁵ EVITAR UTILIZAR EDTA.⁵ Os esfregaços de sangue devem ser corados para detetar a atividade enzimática dentro de 8 horas após a preparação. No entanto, se tal não for possível, a perda gradual da atividade da fosfatase alcalina pode ser retardada por fixação e conservação durante a noite no congelador.⁵ As películas devem ser secas durante, pelo menos, 1 hora antes da fixação e 3 horas após a fixação antes do congelamento.

Notas

Realizar o procedimento utilizando controlos positivos. Estes podem ser obtidos através de doentes com leucocitose piogénica, ou de mulheres no terceiro trimestre de gravidez ou durante os primeiros vários dias pós-parto. Geralmente, as classificações de fosfatase alcalina leucocitária destes doentes excedem 100. É possível preparar um controlo negativo a partir de um esfregaço normal fixado, submergindo-o em água a ferver durante 1 minuto para inativar a enzima. É possível conservar as películas de controlo até 1 ano se forem conservadas fixadas, envoltas em Parafilm® a –70 °C. Estas películas devem ser secas, pelo menos, 1 hora antes da fixação e 3 horas após a fixação antes do congelamento.

Recomenda-se vivamente que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo esperado, característico da população local.

O procedimento depende da classificação subjetiva das células coradas. Isto pode resultar numa ampla variação das classificações obtidas. A temperatura da mistura de reação tem de ser mantida entre 18 e 26 °C. Temperaturas mais baixas resultam em classificações significativamente mais baixas. Acima de 30 °C, ocorrem aumentos acentuados de atividade. Os eosinófilos não coram mas podem ser reconhecidos por núcleos bilobados e grânulos refratários grandes.

Há uma escassez de dados relativos a compostos que possam interferir com a atividade da fosfatase alcalina leucocitária (LAPA). Sabe-se que determinados fármacos e outras substâncias influenciam a atividade da fosfatase alcalina em circulação.⁶ Os contraceptivos orais, o cortisol e o stress podem resultar em classificações elevadas de fosfatase alcalina leucocitária.³

Nos seres humanos, a atividade da fosfatase alcalina restringe-se aos granulócitos maduros e em forma de banda. Ocasionalmente, pode observar-se uma coloração fraca nos linfócitos. Os osteoblastos de medula óssea e as células endoteliais coram fortemente.

Procedimento

NOTA: Para utilização com jarras de Columbia, dividir os volumes de reagentes por 5.

1. Medir 45 ml de água desionizada e ajustar a temperatura para 18–26 °C.
2. Preparar a Solução de Sal de diazônio:
Adicionar 1 ml de solução de nitrito de sódio a 1 ml de solução alcalina-FRV OU
Adicionar 1 ml de solução de nitrito de sódio a 1 ml de solução alcalina-FBB. Misturar por inversão suave. Deixar repousar durante 2 minutos.
3. Adicionar a solução preparada no Passo 2 à água desionizada do Passo 1.
4. Adicionar 1 ml de Solução alcalina de Naftol AS-BI à Solução de Sal de diazônio diluída (Passo 3). Misturar cuidadosamente e verter para uma jarra de Coplin.
5. Aguardar até o Fixador de citrato-acetona-formaldeído estar à temperatura ambiente (18–26 °C). Fixar as lâminas submergindo-as em Solução fixadora durante 30 segundos. Enxaguar suavemente em água desionizada durante 45 segundos. Não permitir que as lâminas sequem.
6. Adicionar lâminas à mistura alcalino-corante (Passo 4) e incubar a 18–26 °C durante 15 minutos. Proteger as lâminas imersas da luz direta. Eliminar mistura alcalino-corante após a utilização.
7. Após 15 minutos de incubação, retirar as lâminas da jarra de Coplin e enxaguar durante 2 minutos em água desionizada. Não permitir que as lâminas sequem.
8. Efetuar a contracoloração durante 2 minutos. Se utilizar a Solução alcalina - FRV, efetuar a contracoloração com a Solução de Hematoxilina, Gill n.º 3. Se utilizar a Solução alcalina - FBB, efetuar a contracoloração com a Solução neutra vermelha, Tamponada.
9. Enxaguar cuidadosamente as lâminas em água da torneira e deixar secar ao ar.
10. Avaliar microscopicamente. Se for necessário utilizar lamelas, utilizar apenas um meio de montagem aquoso.

Características do desempenho

Método de classificação

Digitalizar a película (900X) e selecionar uma área fina onde os eritrócitos mal se toquem. Os locais de atividade da fosfatase surgem como grânulos azuis ou vermelhos, dependendo do corante utilizado. Selecionar 100 granulócitos neutrofilos segmentados e em forma banda consecutivos. Classificar de 0 a 4+ com base na quantidade e intensidade do corante precipitado no citoplasma destas células. Consultar a Tabela 1 para obter as características da classificação. A soma das classificações de 100 células é considerada como a pontuação.

Tabela 1. Características da classificação*

Corante azo precipitado no citoplasma				
Classificação das células	Quantidade** (%)	Tamanho do grânulo	Intensidade da coloração	Fundo do citoplasma
0+	Nenhum/a	-	Nenhum/a	Nenhum/a
1+	50	Pequeno	Ténue a moderada	Incolor a rosa ou azul muito claro
2+	50-80	Pequeno	Moderada a forte	Incolor a rosa ou azul claro
3+	80-100	Médio a grande	Forte	Incolor a rosa ou azul
4+	100	Médio a grande	Brilhante	Não visível

* A Tabela 1 representa a modificação das observações feitas por Kaplow.^{2,3}

** Percentagem do volume de citoplasma ocupado pelo corante azo precipitado.

Para obter a pontuação da atividade da fosfatase alcalina leucocitária (LAPA), o número de células contadas é multiplicado pelo valor da classificação das células. Estes valores são adicionados para obter a classificação da LAPA, conforme apresentado nos seguintes exemplos:

Classificação das células	Classificação contada	Classificação da LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

As seguintes classificações de 40 indivíduos saudáveis foram obtidas na Sigma-Aldrich utilizando o procedimento descrito.

Vermelho violeta rápido LB	Azul rápido BB
Média da LAPA ± 1SD	76±3194±39
Intervalo da LAPA	44-10655-133

O intervalo de classificações normais é amplo, variando entre 20 a 180. O seguinte intervalo de classificações foi obtido através desses 40 indivíduos normais:

Vermelho violeta rápido LB	Azul rápido BB
20-146	25-180

Se os resultados observados variarem dos resultados previstos, contacte a Assistência técnica da Sigma-Aldrich para obter ajuda.

Características do desempenho analítico

Os resultados do desempenho analítico para os testes indicados realizados em todas as estruturas alvo, confirmam uma sensibilidade de 100%, especificidade e repetibilidade.

N.º de cat.	Descrição do produto	Alvo	Especificidade intraensaio	Sensibilidade intraensaio	Especificidade interensaio	Sensibilidade interensaio
861	Solução alcalina de Naftol AS-BI	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
862	Solução alcalina-FRV	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
863	Solução alcalina-FBB	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
914	Solução de Nítrito de sódio	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
915	Solução de Citrato	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
GHS3	Solução de Hematoxilina, Gill n.º 3	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
N6264	Solução neutra vermelha, Tamponada	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Avisos e Perigos

Consulte a Folha de Dados de Segurança e a rotulagem do produto para obter informações atualizadas sobre riscos, perigos ou segurança.

86C:



H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H302 Nocivo por ingestão.

H315 Provoca irritação cutânea.

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

H319 Provoca irritação ocular grave.

H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H411 Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P234 Mantenha sempre o produto na sua embalagem original.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P280 Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

P301 + P312 EM CASO DE INGESTÃO: Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente com água.

P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cautelosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

86R:



H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H302 Nocivo por ingestão.

H315 Provoca irritação cutânea.

H318 Provoca lesões oculares graves.

H373 Pode afetar os órgãos (Rins) após exposição prolongada ou repetida em caso de ingestão.

P234 Mantenha sempre o produto na sua embalagem original.

P280 Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

P301 + P312 EM CASO DE INGESTÃO: Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente com água.

P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cautelosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

P314 Em caso de indisposição, consulte um médico.

Caso tenha ocorrido algum incidente grave durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, comunique-o ao fabricante e/ou ao respetivo representante autorizado e à sua autoridade nacional.

Definições dos símbolos

Símbolos conforme definidos na norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar as instruções de utilização		Código do lote
	Representante autorizado na Comunidade Europeia/União Europeia		Declaração de Conformidade da União Europeia (definida na diretiva RDIV 2017/746)
	Data de validade		Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Limite de temperatura		Atenção
	Data de fabrico		Importador
	Indica o representante autorizado na Suíça		

Referências

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248-250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Informações de contacto

Para encomendar, visite o nosso site em [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para Assistência técnica, visite a página de assistência técnica no nosso site [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Histórico de revisões

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
	Transferência para novo modelo com a marca atual. Especificação para utilização profissional na utilização prevista e nas precauções. Revisão da utilização prevista para alinhamento com as diretrizes do regulamento relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro (RDIV). Atualização de Folha de Dados de Segurança do Material para Folha de Dados de Segurança. Atualização das informações de contacto. Remoção da instrução para seguir o CLSI na colheita de amostras. Remoção da norma EN 980 e alteração para a norma EN ISO 15223-1:2021 nos símbolos. Adição de informações de contacto em caso de eventos adversos. Adição de uma tabela de histórico de revisões. Adição de avisos e perigos. Adição de informações CH-REP.
Rev. 6.0	2024
	Número de documento interno corrigido.

	Sigma-Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany +1(314) 771-5765		MDSS GmbH Schiffgraben 41 30175 Hannover, Germany		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
	MDSS CH GmbH Laurenzenvorstadt 61 5000 Aarau Switzerland				

O M inicial e Sigma-Aldrich são marcas comerciais da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha ou das respetivas afiliadas. Todas as outras marcas comerciais pertencem aos respetivos proprietários. Estão disponíveis informações detalhadas sobre marcas comerciais através de recursos acessíveis ao público.

Sigma-Aldrich®

Οδηγίες χρήσης

Κιτ αλκαλικής φωσφατάσης λευκοκυττάρων

Διαδικασία αρ. 86

IVD

CE

MERCK

Προοριζόμενη χρήση

Τα κιτ αλκαλικής φωσφατάσης της Sigma-Aldrich προορίζονται ως ιστολογική χρώση γενικής εργαστηριακής χρήσης. Τα αντιδραστήρια αλκαλικής φωσφατάσης προορίζονται μόνο για επαγγελματική «in vitro» διαγνωστική χρήση». Αυτή η μη αυτόματη, ποιοτική, ιστοχημική διαδικασία αναγνωρίζει τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στα λευκοκύτταρα σε φιλμ ανθρώπινου αίματος ή μυελού των οστών. Η ιστολογική οπτικοποίηση της σχετιζόμενης με τα λευκοκύτταρα αλκαλικής φωσφατάσης είναι μια μοναδική τεχνική που επί του παρόντος χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική.

Στον αιμοποιητικό ιστό, η αλκαλική φωσφατάση φαίνεται να περιορίζεται στα πολυμορφονύκηνα και ραβδόκυρνα ουδετερόφιλα.^{1,2} Η αναγνώριση της με ταυτόχρονη αποτύπωση χρησιμοποιώντας υποκατεστημένες ναφθόλες και άλατα διαζωνίου είναι, ίσως, το πιο πρώιμο παράδειγμα κυτταροχημικής ενζυμικής δοκιμής με κλινική σημασία.³

Οι περισσότερες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παρέχονται από τη Sigma-Aldrich, χρησιμοποιούν σταθερά άλατα διαζωνίου. Αυτά σχηματίζονται με αντίδραση μιας αρυλαμίνης με νιτρώδες νάτριο σε ένα όξινο μέσο.⁴ Το προκύπτον χλωριούχο διαζώνιο (συνήθως ασταθές) μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε επεξεργασία με ενώσεις όπως χλωριούχος ψευδάργυρος, θειικός ψευδάργυρος ή ναφθαλενο-1,6-διισουλφονικό, σχηματίζοντας σταθερά άλατα. Αυτοί οι σταθεροποιητές ενδέχεται να ασκούν έντονη ανασταλτική δράση σε ορισμένα ενζυματικά συστήματα, ενώ τα χλωριούχα διαζώνια είναι λιγότερο ανασταλτικά.⁴ Για αυτόν τον λόγο, η Sigma-Aldrich παρέχει πλέον σταθερά διάλυμα βάση fast red violet LB, βάση fast blue BB και νιτρώδους νατρίου για την κυτταροχημεία της αλκαλικής φωσφατάσης. Προκειμένου να απλοποιηθούν περαιτέρω αυτές οι μέθοδοι, περιλαμβάνεται επίσης ένα σταθερό διάλυμα naphthol AS-BI phosphate.

Για να πραγματοποιηθεί η δοκιμή, μονιμοποιημένα φιλμ αίματος επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) σε διάλυμα που περιέχει naphthol AS-BI phosphate και πρόσφατα παρασκευασμένο άλας fast red violet LB ή άλας fast blue BB ρυθμιζόμενο σε pH 9,5 με 2-αμινο-2-μεθυλ-1,3-προπανοδιόλη AMPD. Τα σημεία δραστηριότητας είναι είτε κόκκινα είτε μπλε, ανάλογα με την επιλογή του άλατος διαζωνίου. Η διαδικασία που ενσωματώνει το fast red violet LB είναι παρόμοια με μια προτεινόμενη μέθοδο αναφοράς του NCCLS.⁵

Αντιδραστήρια

Αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-BI (Αρ. καταλόγου 861-10ML)

Naphthol AS-BI phosphate, 4 mg/mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα AMPD, 2 mol/L, pH 9,5. Προεidoποίηση. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού. Αποφύγετε να αναπνέετε ατμούς.

Αλκαλικό διάλυμα FRV (Αρ. καταλόγου 862-10ML)

Βάση Fast red violet LB, 5 mg/mL, σε υδροχλωρικό οξύ, 0,4 mol/L, με σταθεροποιητή. Προεidoποίηση. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.

Αλκαλικό διάλυμα FBB (Αρ. καταλόγου 863-10ML)

Βάση Fast blue BB, 5 mg/mL, C.I. 37175, σε υδροχλωρικό οξύ, 0,4 mol/L, με σταθεροποιητή

Διάλυμα νιτρώδους νατρίου (Αρ. καταλόγου 914-10ML)

Νιτρώδες νάτριο, 0,1 mol/L

Κιτρικό διάλυμα (Αρ. καταλόγου 915-50ML)

Κιτρικό οξύ, 18 mmol/L, κιτρικό νάτριο, 9 mmol/L, χλωριούχο νάτριο, 12 mmol/L με επιφανειοδραστικό, ρυθμισμένο σε pH 3,6

Διάλυμα αιματοξυλίνης, Gill αρ. 3 (Αρ. καταλόγου GHS3-50ML)

Αιματοξυλίνη, πιστοποιημένη, 6,0 g/l, C.I. 75290, ιωδικό νάτριο, 0,6 g/l και θειικό αργίλιο, 52,8 g/l, με σταθεροποιητές. Κίνδυνος. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

Διάλυμα ουδέτερου κόκκινου, ρυθμισμένο (Αρ. καταλόγου N6264-50ML)

Ουδέτερο κόκκινο, πιστοποιημένο, 0,5% w/v, C.I. 50040, σε οξικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,2. Έχει προστεθεί συντηρητικό.

Ειδικά υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Ακετόνη, αντιδραστήριο ACS
- Φορμαλδεΰδη, 37% ACS

Φύλαξη και σταθερότητα

Φυλάσσετε το αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-BI, το αλκαλικό διάλυμα FRV, το αλκαλικό διάλυμα FBB και το διάλυμα νιτρώδους νατρίου σε ψυγείο (2–8°C). Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης. Φυλάσσετε το κιτρικό διάλυμα σε ψυγείο (2–8°C). Το διάλυμα είναι κατάλληλο για χρήση απουσία μικροβιακής ανάπτυξης.

Φυλάσσετε το διάλυμα αιματοξυλίνης και το διάλυμα ουδέτερου κόκκινου σε θερμοκρασία δωματίου (18–26°C). Προστατέψτε το διάλυμα αιματοξυλίνης από το φως. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Αλλοίωση

Απορρίψτε το διάλυμα αιματοξυλίνης εάν γίνει καφέ (υπεροξειδωση από τον αέρα) ή μοβ (απώλεια οξύτητας).

Παρασκευή

Τα αντιδραστήρια παρέχονται έτοιμα για χρήση.

Μονιμοποιητικό κιτρικού-ακετόνης-φορμαλδεΰδης: Σε 25 mL κιτρικού διαλύματος, Αρ. καταλόγου 915-50ML, προσθέστε 65 mL ακετόνης και 8 mL φορμαλδεΰδης 37%. Τοποθετήστε σε γυάλινη φιάλη και κλείστε ερμητικά το καπάκι. Φυλάσσετε σε ψυγείο (2–8°C). Θερμάνετε στους 18–26°C πριν από τη χρήση. Σταθερό για έως και 4 εβδομάδες, εάν φυλαχθεί σε ψυγείο με το καπάκι ερμητικά κλειστό.

Προφυλάξεις

Αυτά τα βοηθήματα IVD προορίζονται για in vitro διαγνωστική χρήση σε περιβάλλον κλινικού εργαστηρίου. Αυτά τα βοηθήματα IVD προορίζονται για επαγγελματική χρήση μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό. Τα βοηθήματα IVD της Sigma-Aldrich μπορούν να χρησιμοποιούνται από εργαστηριακό

προσωπικό το οποίο είναι εκπαιδευμένο να χειρίζεται ανθρώπινα δείγματα που μπορεί να είναι μολυσματικά, να χρησιμοποιεί μικροσκόπια και άλλον εργαστηριακό εξοπλισμό και διαθέτει αντίληψη των κινδύνων και οπτική οξύτητα για να διακρίνει τα χρώματα και άλλα αντικείμενα κάτω από μικροσκόπιο.

Πρέπει να ακολουθούνται οι συνήθειες προφυλάξεως κατά τον χειρισμό εργαστηριακών αντιδραστηρίων. Απορρίψτε τα απόβλητα πρώτων όλους τους τοπικούς, πολιτειακούς, περιφερειακούς ή εθνικούς κανονισμούς.

Διαδικασία

Συλλογή δειγμάτων

Καμία γνωστή μέθοδος δοκιμσίας δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διαβεβαίωση ότι τα δείγματα αίματος ή ιστού δεν θα μεταδώσουν λοίμωξη. Επομένως, όλα τα παράγωγα αίματος ή τα δείγματα ιστού θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσφατα παρασκευασμένα φιλμ αίματος ή μυελού των οστών ή δείγματα με ηπαρίνη.⁵ ΑΠΟΦΥΓΕΤΕ το EDTA.⁵ Τα επιχρίσματα αίματος θα πρέπει να χρωματίζονται για ενζυμική δραστηριότητα εντός 8 ωρών μετά την παρασκευή. Ωστόσο, εάν αυτό δεν είναι δυνατό, η σταδιακή απώλεια της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί να καθυστερήσει με μονιμοποίηση και φύλαξη κατά τη διάρκεια της νύχτας σε καταψύκτη.⁵ Τα φιλμ θα πρέπει να στεγνώνουν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη μονιμοποίηση και 3 ώρες μετά τη μονιμοποίηση πριν από την κατάψυξη.

Σημειώσεις

Εκτελέστε τη διαδικασία χρησιμοποιώντας θετικά υλικά ελέγχου. Αυτά μπορούν να ληφθούν από ασθενείς με πυογενή λευκοκυττάρωση ή γυναίκες στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης ή κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τον τοκετό. Οι βαθμολογίες αλκαλικής φωσφατάσης λευκοκυττάρων από αυτά τα άτομα συνήθως υπερβαίνουν το 100. Ένα αρνητικό υλικό ελέγχου μπορεί να παρασκευαστεί από ένα κανονικό μονιμοποιημένο επιχρίσμα, εμβαπτίζοντάς το σε βραστό νερό για 1 λεπτό ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο. Τα φιλμ ελέγχου μπορούν να διατηρηθούν έως και 1 έτος εάν φυλαχθούν μονιμοποιημένα, τυλιγμένα σε ParaFilm® στους –70°C. Αυτά τα φιλμ πρέπει να στεγνώνουν τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη μονιμοποίηση και 3 ώρες μετά τη μονιμοποίηση πριν από την κατάψυξη.

Συνιστάται ανεπιφύλακτα κάθε εργαστήριο να καθορίζει το δικό του αναμενόμενο εύρος, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για τον τοπικό πληθυσμό.

Η διαδικασία εξαρτάται από την υποκειμενική αξιολόγηση των χρωματισμένων κυττάρων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ευρεία διακύμανση των αξιολογήσεων που λαμβάνονται. Η θερμοκρασία του μείγματος αντίδρασης πρέπει να διατηρείται μεταξύ 18–26°C. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες θα έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικά χαμηλότερες βαθμολογίες. Πάνω από τους 30°C, θα εμφανιστούν αξιοσημείωτες αυξήσεις στη δραστηριότητα. Τα ρωσινόφιλα δεν χρωματίζονται, αλλά μπορούν να αναγνωριστούν από τους δилоβους πυρήνες και τα μεγάλα διαθλαστικά κοκκία.

Υπάρχουν πολύ περιορισμένα στοιχεία για τις ενώσεις που μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων (LAPA). Ορισμένα φάρμακα και άλλες ουσίες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα της κυκλοφορούσας αλκαλικής φωσφατάσης.⁶ Τα από του στόματος αντιπυλινικά, η καρτζιλόλη και το ζμπρε μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένες βαθμολογίες αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων.³

Στους ανθρώπους, η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης περιορίζεται στα ώριμα και ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Περιστασιακά, μπορεί να παρατηρείται ασθενής χρώση στα λεμφοκύτταρα. Οι οστεοβλάστες του μυελού των οστών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα χρωματίζονται έντονα.

Διαδικασία

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για χρήση με δοχεία Columbia, διαιρέστε τους όγκους του αντιδραστηρίου με το 5.

- Μετρήστε 45 mL αποιονισμένο νερό και ρυθμίστε τη θερμοκρασία στους 18–26°C.
- Παρασκευάστε διάλυμα άλατος διαζωνίου: Προσθέστε 1 mL διαλύματος νιτρώδους νατρίου σε 1 mL αλκαλικού διαλύματος FRV ή Προσθέστε 1 mL διαλύματος νιτρώδους νατρίου σε 1 mL αλκαλικού διαλύματος FBB. Αναμείξτε με ήπια αναστροφή. Αφήστε το μείγμα να παραμείνει σε ηρεμία για 2 λεπτά.
- Προσθέστε το διάλυμα που παρασκευάστηκε στο Βήμα 2 στο αποιονισμένο νερό από το Βήμα 1.
- Προσθέστε 1 mL αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-BI σε αραιωμένο διάλυμα άλατος διαζωνίου (Βήμα 3). Αναμείξτε καλά και ρίξτε σε ένα δοχείο Corlin.
- Φέρτε το μονιμοποιητικό κιτρικού-ακετόνης-φορμαλδεΰδης σε θερμοκρασία δωματίου (18–26°C). Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους με εμβάπτιση σε μονιμοποιητικό διάλυμα για 30 δευτερόλεπτα. Ξεπλύνετε ήπια σε αποιονισμένο νερό για 45 δευτερόλεπτα. Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
- Προσθέστε τις αντικειμενοφόρους στο μείγμα αλκαλικής χρωστικής (Βήμα 4) και επωάστε στους 18–26°C για 15 λεπτά. Προστατέψτε τις εμβαπτισμένες αντικειμενοφόρους από το άμεσο ηλιακό φως. Απορρίψτε το μείγμα αλκαλικής χρωστικής μετά τη χρήση.
- Μετά από 15 λεπτά επώασης, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin και ξεπλύνετε για 2 λεπτά σε αποιονισμένο νερό. Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
- Πραγματοποιήστε αντίχρωση για 2 λεπτά. Εάν χρησιμοποιείτε αλκαλικό διάλυμα FRV, πραγματοποιήστε αντίχρωση με διάλυμα αιματοξυλίνης, Gill αρ. 3. Εάν χρησιμοποιείτε αλκαλικό διάλυμα FBB, πραγματοποιήστε αντίχρωση με διάλυμα ουδέτερου κόκκινου, ρυθμισμένο.
- Ξεπλύνετε καλά τις αντικειμενοφόρους σε νερό βρύσης και στεγνώστε στον αέρα.
- Αξιολογήστε μικροσκοπικά. Εάν απαιτείται κάλυψη με καλυπτρίδα, χρησιμοποιήστε μόνο υδατικά μέσα κάλυψης.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τρόπος βαθμολόγησης

Σαρώστε το φιλμ (900X) και επιλέξτε μια λεπτή περιοχή στην οποία μόλις που ακουμπούν τα ερυθροκύτταρα. Τα σημεία δραστηριότητας της φωσφατάσης θα εμφανίζονται με τη μορφή μπλε ή κόκκινων κοκκίων, ανάλογα με τη χρωστική που χρησιμοποιήθηκε. Επιλέξτε 100 διαδοχικά ραβδόκυρνα και πολυμορφονύκηνα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Βαθμολογήστε από 0 έως 4+ με βάση την ποσότητα και την ένταση της καταβυθισμένης χρωστικής μέσα στο κυτταρόπλασμα αυτών των κυττάρων. Για τα χαρακτηριστικά της βαθμολογίας, ανατρέξτε στον Πίνακα 1. Το άθροισμα των αξιολογήσεων 100 κυττάρων θεωρείται η βαθμολογία.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά βαθμολογίας*

Καταβυθισμένη αζωχρωστική στο κυτταρόπλασμα				
Βαθμολογία κυττάρου	Ποσότητα** (%)	Μένεθος κοκκίου	Ένταση χρώσης	Υπόβαθρο κυτταροπλάσματος
0+	Καθόλου	-	Καθόλου	Καθόλου
1+	50	Μικρό	Αμυδρή έως μέτρια	Άχρωμο έως πολύ απαλό ροζ ή μπλε
2+	50-80	Μικρό	Μέτρια έως έντονη	Άχρωμο έως απαλό ροζ ή μπλε
3+	80-100	Μεσαίο έως μεγάλο	Έντονη	Άχρωμο έως ροζ ή μπλε
4+	100	Μεσαίο έως μεγάλο	Πολύ έντονη	Μη ορατή

* Ο Πίνακας 1 αντιπροσωπεύει την τροποποίηση των παρατηρήσεων που έγιναν από τον Karlow.^{2,3}

** Ποσοστό όγκου του κυτταροπλάσματος που καταλαμβάνεται από ίζημα αζωχρωστικής.

Για να ληφθεί η βαθμολογία της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων (LAPA), ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν πολλαπλασιάζεται με την τιμή για τη βαθμολογία κυττάρου. Αυτοί οι αριθμοί προστίθενται για να ληφθεί η βαθμολογία LAPA όπως φαίνεται στα ακόλουθα παραδείγματα:

Βαθμολογία κυττάρου	Καταμετρηθείσα βαθμολογία	Βαθμολογία LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Σύνολο	100	67

Οι ακόλουθες βαθμολογίες από 40 υγιή άτομα ελήφθησαν στη Sigma-Aldrich χρησιμοποιώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Μέσος όρος LAPA ± 1SD	76±31	94±39
Εύρος LAPA	44-106	55-133

Το εύρος των κανονικών βαθμολογιών είναι μεγάλο και κυμαίνεται από 20 έως 180. Το ακόλουθο εύρος βαθμολογιών ελήφθη από αυτά τα 40 φυσιολογικά άτομα:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Εάν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα διαφέρουν από τα αναμενόμενα, επικοινωνήστε με την τεχνική εξυπηρέτηση της Sigma-Aldrich για βοήθεια.

Χαρακτηριστικά απόδοσης της ανάλυσης

Τα αποτελέσματα απόδοσης της ανάλυσης για τις δεδομένες δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε όλες τις στοχευόμενες δομές, επιβεβαιώνουν την ευαισθησία, την ειδικότητα και την επαναληψιμότητα σε ποσοστό 100%.

Αρ. καταλόγου	Περιγραφή προϊόντος	Στόχος	Ειδικότητα εντός της ανάλυσης	Ευαισθησία εντός της ανάλυσης	Ειδικότητα μεταξύ των αναλύσεων	Ευαισθησία μεταξύ των αναλύσεων
861	Αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-BI	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
862	Αλκαλικό Διάλυμα FRV	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
863	Αλκαλικό Διάλυμα FBB	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
914	Διάλυμα νιτρώδους νατρίου	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
915	Κιτρικό διάλυμα	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
GHS3	Διάλυμα αιματοξυλίνης, Gill αρ. 3	Πυρήνες	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
N6264	Διάλυμα ουδέτερου κόκκινου, ρυθμισμένο	Πυρήνες	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3

Προειδοποιήσεις και κίνδυνοι

Ανατρέξτε στο Δελτίο δεδομένων ασφαλείας και στην επισήμανση προϊόντος για οποιαδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνων ή ασφαλείας.

86C:



H290 Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.

H302 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.

H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.

H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.

H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

H335 Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.

H411 Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

P234 Να διατηρείται μόνο στην αρχική συσκευασία.

P273 Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.

P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P301 + P312 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό, αν αισθανθείτε αδιαθεσία.

P302 + P352 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.

P305 + P351 + P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εάν είναι εύκολο. Συνεχίστε την έκπλυση.

86R:



H290 Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.

H302 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.

H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.

H318 Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα όργανα (νεφροί) ύστερα από παρατεταμένη ή επανειλημμένη έκθεση, σε περίπτωση κατάποσης.

P234 Να διατηρείται μόνο στην αρχική συσκευασία.

P280 Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P301 + P312 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό, αν αισθανθείτε αδιαθεσία.

P302 + P352 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.

P305 + P351 + P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εάν είναι εύκολο. Συνεχίστε την έκπλυση.

P314 Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

Εάν, κατά τη διάρκεια της χρήσης αυτού του βοηθήματος ή ως αποτέλεσμα της χρήσης του, έχει συμβεί κάποιο σοβαρό περιστατικό, παρακαλείστε να το αναφέρετε στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στην εθνική αρχή της χώρας σας.

Ορισμοί συμβόλων

Σύμβολα όπως ορίζονται στο EN ISO 15223-1:2021

	Κατασκευαστής		Αριθμός καταλόγου
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Αριθμός παρτίδας
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα/ Ευρωπαϊκή Ένωση		Δήλωση συμμόρφωσης Ευρωπαϊκής Ένωσης (όπως ορίζεται στην οδηγία IVDR 2017/746)
	Ημερομηνία λήξης		In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Όριο θερμοκρασίας		Προσοχή
	Ημερομηνία παραγωγής		Εισαγωγέας
	Υποδεικνύει τον Εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπο στην Ελβετία		

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, σελ. 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, σελ. 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για να κάνετε μια παραγγελία, παρακαλούμε επισκεφθείτε τον ιστότοπό μας στη διεύθυνση SigmaAldrich.com. Για την τεχνική εξυπηρέτηση, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη σελίδα τεχνικής εξυπηρέτησης στον ιστότοπό μας στη διεύθυνση SigmaAldrich.com/techservice.

Ιστορικό αναθεωρήσεων

Αναθ. 3.0	2014
Αναθ. 4.0	2016
Αναθ. 5.0	2023
	Έγινε μεταφορά σε νέο υπόδειγμα με την τρέχουσα επωνυμία. Προσδιορίστηκε για επαγγελματική χρήση στην προοριζόμενη χρήση και τις προφυλάξεις. Η προοριζόμενη χρήση αναθεωρήθηκε για ευθυγράμμιση με τις κατευθυντήριες γραμμές IVDR. Το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού ενημερώθηκε σε Δελτίο δεδομένων ασφαλείας. Ενημερώθηκαν οι πληροφορίες επικοινωνίας. Αφαιρέθηκε η οδηγία να ακολουθείται το CLSI για τη συλλογή δειγμάτων. Αφαιρέθηκε το EN 980 και άλλαξε σε EN ISO 15223-1:2021 για τα σύμβολα. Προστέθηκαν πληροφορίες επικοινωνίας για ανεπιθύμητα συμβάντα. Προστέθηκε πίνακας ιστορικού αναθεωρήσεων. Προσθήκη προειδοποιήσεων και κινδύνων. Προσθήκη πληροφοριών αντιπροσώπου Ελβετίας.
Αναθ. 6.0	2024
	Διόρθωση αριθμού εσωτερικού εγγράφου.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Το αρχικό γράμμα M και το Sigma-Aldrich είναι εμπορικά σήματα της Merck KGaA, Darmstadt, Germany ή των συνδεδεμένων με αυτήν εταιρειών. Όλα τα άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα είναι διαθέσιμες μέσω δημοσίων προσβάσιμων πόρων.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Használati utasítás

Leukocita alkalikus foszfátáz készlet

86. sz. eljárás



Rendeltetésszerű használat

A Sigma-Aldrich alkalikus foszfátáz készlet általános laboratóriumi felhasználásra szánt szövettani festék. Az alkalikus foszfátáz reagensek kizárólag professzionális „in vitro diagnosztikai felhasználásra” szolgálnak. Ez a manuális, kvalitatív hisztokémiai eljárás kimutatja az alkalikus foszfátáz aktivitást az emberi vér- és csontvelőkenetekben lévő leukocitákban. A leukocitákhoz kapcsolódó alkalikus foszfátáz szövettani megjelenítése egy egyedülálló, az orvostudományban jelenleg általánosan használt technika.

A hematopoetikus szövetekben az alkalikus foszfátáz a szalagos és szegmentált neutrofil sejtekre korlátozódik.^{1,2} A citokémiai enzimek klinikai jelentőséggel bíró vizsgálatának legkorábbi példája talán az alkalikus foszfátáz szubsztituált naftolok és diazoniumsók egyidejű rögzítésével történő kimutatása.³

A legtöbb eljárás, beleértve a Sigma-Aldrich által biztosított eljárást is, stabil diazóniumsókat alkalmaz. Ezeket egy arilamin vegyület és a nátrium-nitrit savas közegben történő reakciójával hozzák létre.⁴ A keletkező diazónium-klorid (általában instabil) ezután olyan vegyületekkel kezelhető, mint a cink-klorid, a cink-szulfát vagy a naftalén-1,6-diszulfonát, így stabil sók képződnek. Ezek a stabilizátorok jelentős gátlást fejthetnek ki egyes enzimrendszerekre, míg a diazónium-kloridok kevésbé gátló hatásúak.⁴ Ezért a Sigma-Aldrich a Fast Red Violet LB bázis, Fast Blue BB bázis és nátrium-nitrit stabil oldatát biztosítja az alkalikus foszfátáz kimutatását célzó citokémiai vizsgálatokhoz. A módszerek további egyszerűsítése érdekében a rendszer tartalmaz egy stabil, naftol-AS-BI-foszfát oldatot is.

A vizsgálat elvégzéséhez a fixált vérkeneteket szobahőmérsékleten (18–26 °C-on) kell inkubálni naftol-AS-BI-foszfátot, valamint frissen készített, 2-amino-2-metil-1,3-propándiollal (AMPD) 9,5-es pH-ra pufferelt Fast Red LB sötét vagy Fast Blue BB sötét tartalmazó oldatban. Az aktivitás helyei az alkalmazott diazóniumsóktól függően lehetnek pirosak vagy kékek. A Fast Red Violet LB-t alkalmazó eljárás hasonló az NCCLS által javasolt referenciamódszerhez.⁵

Reagensek

Naftol-AS-BI alkalikus oldat (kat. sz.: 861-10ML)

Naftol-AS-BI-foszfát, 4 mg/ml, AMPD pufferben, 2 mol/l, pH-érték: 9,5. Figyelmeztetés. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Légúti irritációt okozhat. Kerülje a gőzök belegégését.

FRV alkalikus oldat (kat. sz.: 862-10ML)

Fast Red Violet LB bázis, 5 mg/ml, sósavban (0,4 mol/l), stabilizálószerrel. Figyelmeztetés. Lenyelve ártalmas.

FBB alkalikus oldat (kat. sz.: 863-10ML)

Fast Blue BB bázis, 5 mg/ml, C.I. 37175, sósavban (0,4 mol/l), stabilizálószerrel.

Nátrium-nitrit oldat (kat. sz.: 914-10ML)

Nátrium-nitrit, 0,1 mol/l.

Citrátoldat (kat. sz.: 915-10ML)

Citromsav, 18 mmol/l; nátrium-citrát, 9 mmol/l; nátrium-klorid, 12 mmol/l és felületaktív anyag, pufferelt pH-érték: 3,6

Hematoxilinoldat, Gill III (kat. sz.: GHS3-50ML)

Hematoxilin (tanúsított), 6,0 g/l, C.I. 75290; nátrium-jodát, 0,6 g/l; alumínium-szulfát, 52,8 g/l és stabilizálószer. Veszély. Lenyelve ártalmas. Súlyos szemkárosodást okoz. Védkesztyű/ szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Neutrálvörös oldat, pufferelt (kat. sz.: N6264-50ML)

Neutrálvörös (tanúsított), 0,5% (w/v), C.I. 50040, acetát pufferben, pH-érték: 5,2. Tartósítószer tartalmaz.

Szükséges, de nem biztosított speciális anyagok

- Aceton, ACS-reagensminőség
- Formaldehid, 37%, ACS

Tárolás és stabilitás

A naftol-AS-BI alkalikus oldatot, FRV alkalikus oldatot, FBB alkalikus oldatot és nátrium-nitrit oldatot hűtőszekrényben (2–8 °C) kell tárolni. A reagensek a lejárati dátumig stabilak. A citrátoldatot hűtőszekrényben (2–8 °C) kell tárolni. Az oldat mikrobiális növekedés hiányában használható.

A hematoxilinoldatot és neutrálvörös oldatot szobahőmérsékleten (18–26 °C) kell tárolni. A hematoxilinoldatot védeni kell a fénytől. A reagensek a lejárati dátumig stabilak.

Bomlás

Dobja ki a hematoxilinoldatot, ha az oldat megbarnul (túloxidálódott a levegőn) vagy lilává válik (savasság elvesztése).

Előkészítés

A reagensek használatra készek.

Citrát-aceton-formaldehid rögzítőoldat: 25 ml citrátoldathoz (kat. sz.: 915-50ML) adjon 65 ml acetont és 8 ml 37%-os formaldehidet. Tegye üvegtartályba, és szorosan zárja le kupakkal. Hűtőszekrényben tárolandó (2–8 °C). Használat előtt melegítse 18–26 °C-ra. Hűtőszekrényben, szorosan lezárva tárolva 4 hétig stabil.

Óvintézkedések

Ezeket az in vitro diagnosztikai eszközöket klinikai laboratóriumi környezetben történő in vitro diagnosztikai felhasználásra szánták. Ezeket az in vitro diagnosztikai eszközöket csak képzett szakemberek használhatják. A Sigma-Aldrich in vitro diagnosztikai eszközöket olyan laboratóriumi személyzet üzemeltetheti, akik képzettek az esetlegesen fertőző emberi minták kezelésére, mikroszkópok és egyéb laboratóriumi berendezések használatában, valamint kellő színerővel és látásélességgel rendelkeznek a színek és egyéb tárgyak mikroszkóp alatt történő megkülönböztetésére.

A laboratóriumi reagensok kezelése során a szokásos óvintézkedéseket kell követni. A hulladékot a helyi, állami, tartományi vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Eljárás

Mintavétel

Egyetlen ismert vizsgálati módszer sem nyújt teljes bizonyosságot arra nézve, hogy a vérminták vagy szövetek nem továbbítanak fertőzést. Ezért minden vérkészítményt vagy szövetmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

Friss vér- vagy csontvelőkenetek vagy heparinnal antikoagulált minták használhatók.⁵ KERÜLJE AZ EDTA ALKALMAZÁSÁT.⁵ A vérkeneteket az elkészítéstől számított 8 órán belül meg kell festeni az enzimaktivitás tekintetében. Ha azonban ez nem lehetséges, az alkalikus foszfátáz aktivitásának fokozatos megszűnését a rögzítés és az éjszakai át fagyaszttva történő tárolás késleltetheti.⁵ A keneteket a rögzítés előtt legalább 1 órával, a rögzítést követően a fagyasztás előtt pedig 3 órával meg kell szárítani.

Megjegyzések

Végezze az eljárást pozitív kontrollok alkalmazásával. Ilyen mintákat piogén leukocitózisban szenvedő betegektől, illetve a terhesség harmadik trimeszterében vagy a szülés utáni első néhány napon belül lévő nőktől lehet szerezni. Ezen személyeknél a leukocita alkalikus foszfátázra vonatkozó értékek általában meghaladják a 100-at. Egy normál rögzített kenetből úgy készíthető negatív kontroll, hogy az enzimet 1 percg forrásban lévő vízbe meríti az enzim inaktiválásához. A kontrollkenetek 1 évig is megőrizhetők, ha rögzítet állapotban, –70 °C-on Parafilm®-be csomagolva tárolják őket. Ezeket a keneteket a rögzítés előtt legalább 1 órával, a rögzítést követően a fagyasztás előtt pedig 3 órával meg kell szárítani.

Kifejezetten ajánlott, hogy minden laboratórium saját, a helyi lakosságra jellemző, várható kórtípusokat határozzon meg.

Az eljárás a megfestett sejtek szubjektív minősítésétől függ. Ez a kapott minősítések széles skáláját eredményezheti. A reakcióelegy hőmérsékletét 18–26 °C között kell tartani. Az alacsonyabb hőmérséklet lényegesen alacsonyabb pontszámot eredményez. 30 °C felett az aktivitás számottevő emelkedése tapasztalható. Az eozinofil sejtek nem festődnek, de felismerhetők a kétkaréjos sejtmagok és a nagy, fénytörést mutató granulumok miatt.

Kevés adat áll rendelkezésre olyan vegyületekről, amelyek befolyásolhatják a leukociták alkalikus foszfátázának aktivitását (LAPA). Egyes gyógyszerekről és más anyagokról ismert, hogy hatással vannak a keringő alkalikus foszfátáz aktivitására.⁶ Az orális fogamzásgátlók, a kortizol és a stressz a leukocita alkalikus foszfátáz pontszámának emelkedését eredményezheti.³

Emberekben az alkalikus foszfátáz aktivitása az érett és a szalagszerű granulocitákra korlátozódik. A limfocitákban esetenként gyenge festődés figyelhető meg. A csontvelő oszteoblaszt sejtjei és az endotélsejtek erősen festődnek.

Eljárás

MEGJEGYZÉS: A Columbia festőedényekkel való használatához ossza el a reagensmennyiséget 5-tel.

- Mérjen ki 45 ml ioncserélt vizet, és állítsa be a hőmérsékletet 18–26 °C-ra.
- Készítse el a diazóniumsó oldatát:
Adjon 1 ml nátrium-nitrit oldatot 1 ml FRV alkalikus oldathoz, VAGY
Adjon 1 ml nátrium-nitrit oldatot 1 ml FBB alkalikus oldathoz. Keverje finoman fel-le forgatva. Hagyja állni 2 percg.
- Adja a 2. lépésben elkészített oldatot az 1. lépésben leírt ioncserélt vízhez.
- Adjon 1 ml naftol-AS-BI alkalikus oldatot a hígított diazóniumsó-oldathoz (3. lépés). Alaposan keverje össze, és öntse küvétába.
- Melegítse a citrát-aceton-formaldehid rögzítőoldatot szoba-hőmérsékletűre (18–26 °C). Fixálja a tárgylemezeket 30 másodpercg a fixálóba merítve. Öblítse őket óvatosan ioncserélt vízben 45 másodpercg. Ne hagyja, hogy a lemezek megszáradjanak.
- Helyezze a tárgylemezeket az alkalikus festékeverékbe (4. lépés), és inkubálja őket 18–26 °C-on 15 percg. Védje a bemeitett tárgylemezeket a közvetlen fénytől. Használat után az alkalikus festékeveréket ki kell dobni.
- 15 percg inkubáció után vegye ki a lemezeket a küvétából, és öblítse őket 2 percg ioncserélt vízben. Ne hagyja, hogy a lemezek megszáradjanak.
- Végezen ellenfestést 2 percg. FRV alkalikus oldat használata esetén ellenfestésként használjon Gill III-as hematoxilinoldatot. FBB alkalikus oldat használata esetén alkalmazzon pufferelt neutrálvörös oldatot.
- Alaposan öblítse le a tárgylemezeket csapvízben, és hagyja őket a levegőn száradni.
- Végezze el a lemezek mikroszkópos értékelését. Ha fedőlemezelt szükséges, csak vizes fedőközeget használjon.

Teljesítményjellemzők

A pontozás módja

Vizsgálja meg a kenetet (900x), és válasszon ki egy vékony területet, ahol az eritrociták alig érintkeznek. A foszfátázaktivitás helyei a használt festéktől függően kék vagy vörös szemcsékként jelennek meg. Válasszon ki 100 egymást követő szegmentált és szalagos neutrofil granulocitát. A kicsapódott festék citoplazmában megfigyelhető mennyisége és intenzitása alapján osztályozza a sejteket 0 és 4+ között. A pontozási jellemzőket lásd az 1. táblázatban. A pontszám 100 sejt értékelésének összege.

1. táblázat Pontozási jellemzők*

Sejt értékelése	A citoplazmában kicsapódott azofesték			A citoplazma háttere
	Mennyiség**	Sejtméret	Festődés intenzitása	
0+	Nincs	-	Nincs	Nincs
1+	50	Kicsi	Halvány-közepes	Színtelen vagy nagyon halvány rózsaszín, vagy kék
2+	50-80	Kicsi	Közepes-erős	Színtelen vagy halvány rózsaszín, vagy kék
3+	80-100	Közepes-nagy	Erős	Színtelen vagy rózsaszín, vagy kék
4+	100	Közepes-nagy	Ragyogó	Nem látható

* Az 1. táblázat Káplow megfigyeléseinek módosítását mutatja.^{2,3}

** A citoplazma azofestékből képződött csapadék által elfoglalt térfogatának százalékos aránya.

A leukocita alkalikus foszfatáz aktivitási (LAPA) pontszám meghatározásához a megszámlolt sejtek számát meg kell szorozni a sejtmínősítési értékkel. Ezeket a számokat össze kell adni a LAPA-pontszám kiszámításához, amint azt az alábbi példák mutatják:

Sejt értékelése	Összeszámlolt sejtek pontszáma	LAPA-pontszám
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Összesen	100	67

A következő pontszámokat 40 egészséges személy mintáiból nyerték a Sigma-Aldrich vállalatnál a leírt eljárás alkalmazásával.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA átlaga ±1 szórás	76±31	94±39
LAPA-tartomány	44-106	55-133

A normál pontszámok tartománya széles, 20 és 180 között változik. A következő pontszám tartományt 40 egészséges személyre vonatkozóan kapták:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várt eredményektől, kérjük, forduljon a Sigma-Aldrich műszaki szolgálatához segítségért.

Analitikai teljesítményjellemzők

Az adott tesztek analitikai teljesítményjellemzői az összes célstruktúrán vizsgálva 100% érzékenységet, specificitást és ismételhetőséget igazoltak.

Kat. sz.	Termékleírás	Cél	Tesztben belüli specificitás	Tesztben belüli érzékenység	Tesztek közötti specificitás	Tesztek közötti érzékenység
861	Naftol-AS-BI alkalikus oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
862	FRV alkalikus oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
863	FBB alkalikus oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
914	Nátrium-nitrit oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
915	Citrátoldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
GHS3	Hematoxinilindat, Gill III	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3
N6264	Neutrálvíörös oldat, puffereit	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3

Figyelmeztetések és veszélyek

A frissített kockázati, veszélyességi és biztonsági információkért olvassa el a biztonsági adatlapot és a termék címkézését.

86C:



- H290 Fémekre korrozív hatású lehet.
- H302 Lenyelve ártalmas.
- H315 Bőrirritáló hatású.
- H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.
- H319 Súlyos szemirritációt okoz.
- H335 Légúti irritációt okozhat.
- H411 Mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.
- P234 Az eredeti csomagolásban tartandó.
- P273 Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.
- P280 Védőkesztyű/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
- P301 + P312 LENYELÉS ESETÉN: Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
- P302 + P352 HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel.
- P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Folytassa az öblítést.

86R:



- H290 Fémekre korrozív hatású lehet.
- H302 Lenyelve ártalmas.
- H315 Bőrirritáló hatású.
- H318 Súlyos szemkárosodást okoz.
- H373 Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén lenyelve károsíthatja a szerveket (vese).
- P234 Az eredeti csomagolásban tartandó.

P280 Védőkesztyű/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

- P301 + P312 LENYELÉS ESETÉN: Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
- P302 + P352 HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel.
- P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Folytassa az öblítést.
- P314 Rosszullét esetén orvosi ellátást kell kérni.

Ha az eszköz használata során vagy annak használata következtében súlyos baleset történt, kérjük, jelentse azt a gyártónak és/vagy meghatalmazott képviselőjének és a helyi nemzeti hatóságknak.

Jelmagyarázat

Az EN ISO 15223-1:2021 szabványban meghatározott jelek

	Gyártó		Katalógusszám
	Lásd a használati utasítást		Gyártási tétel kódja
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben/Európai Unióban		Az Európai Unió megfelelőségi nyilatkozata (az IVDR 2017/746 meghatározása szerint)
	Lejárat dátum		In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Hőmérsékleti határértékek		Vigyázat!
	Gyártási dátum		Importőr
	Meghatalmazott képviselő Svájcban		

Hivatkozások

- 1. Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- 2. Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- 3. Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- 4. Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- 5. Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- 6. Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- 7. Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Elérhetőségek

Megrendelés leadásához látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Műszaki segítségért látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Átdolgozási előzmények

3.0 átd.	2014
4.0 átd.	2016
5.0 átd.	2023
Áthelyezve az új sablonba a jelenlegi márkajelzéssel. A professzionális használatra vonatkozó megállapítás leírása a rendeltetésszerű használat és az óvintézkedések részekben. A rendeltetésszerű használatra vonatkozó részek átdolgozása az IVDR irányelveknek való megfelelés érdekében. Az Anyagbiztonsági adatlap frissítése Biztonsági adatlapra. Az elérhetőségek frissítése. A mintagyűjtés során a CLSI követésére vonatkozó utasítás eltávolítása. Az EN 980-as szabvány szerinti jelzések eltávolítása és az EN ISO 15223-1:2021 szabvány jelzéseire változtatása. A nemkívánatos eseményekkel kapcsolatos elérhetőségek hozzáadása. Átdolgozási előzménytáblázat hozzáadása. Figyelmeztetések és veszélyek hozzáadása. CH-REP információ hozzáadása.	
6.0 átd.	2024
Javitott belső dokumentumszám.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Az „M” kezdőbetű és a Sigma-Aldrich a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) vagy leányvállalatainak védjegyei. Minden egyéb védjegy a megfelelő tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekre vonatkozó részletes információk nyilvánosan hozzáférhető forrásokon keresztül érhetők el.

Návod k použití

Souprava pro leukocytární alkalickou fosfatázu

Postup č. 86



Určené použití

Soupravy Sigma-Aldrich alkalická fosfatáza jsou určeny pro obecné laboratorní použití jako histologické barvivo. Reagencie alkalické fosfatázy jsou určeny pouze pro profesionální „diagnostické použití in vitro“. Tento manuální, kvalitativní, histochemický postup prokazuje aktivitu alkalické fosfatázy v leukocytech lidské krve nebo kostní dřeně. Histologická vizualizace alkalické fosfatázy asociované s leukocyty je unikátní technikou, která se v současnosti v medicíně běžně používá.

Zdá se, že v hematopoetické tkáni je alkalická fosfatáza omezena na neutrofilní segmenty a tyče.^{1,2} Její prokázání současným zachycením pomocí substituovaných naftolů a diazoniových solí je snad nejranějším příkladem testu s cytochemickými enzymy s klinickým významem.³

Většina postupů, včetně postupů poskytovaných společností Sigma-Aldrich, používá stabilní diazoniové soli. Ty vznikají reakcí arylaminu s dusitanem sodným v kyselém prostředí.⁴ Výsledný diazonium chlorid (obvykle nestabilní) pak může být zpracován se sloučeninami, jako je chlorid zinečnatý, síran zinečnatý nebo naftalen-1,6-disulfonát, za vzniku stabilních solí. Tyto stabilizátory mohou výrazně inhibovat některé enzymatické systémy, zatímco diazonium chloridy jsou méně inhibiční.⁴ Z tohoto důvodu nyní společnost Sigma-Aldrich poskytuje pro cytochemii alkalické fosfatázy stabilní roztoky základu Fast Red Violet LB, základu Fast Blue BB a dusitanu sodného. Pro další zjednodušení těchto metod je zahrnut stabilní roztok naftol AS-BI fosfátu.

K provedení tohoto testu se fixované krevní nátěry inkubují při pokojové teplotě (18–26 °C) v roztoku obsahujícím naftol AS-BI fosfát a čerstvě připravenou sůl Fast Red Violet LB nebo sůl Fast Blue BB pufovanou 2-amino-2-methyl-1,3-propanediolem (AMPD) na pH 9,5. Místa aktivity jsou červená nebo modrá v závislosti na zvolené diazoniové soli. Postup zahrnující činidlo Fast Red Violet LB je podobný navrhované referenční metodě NCCLS.⁵

Činidla

Alkalický roztok naftolu AS-BI (kat. č. 861-10ML)

Naftol AS-BI fosfát, 4 mg/ml, v pufru AMPD, 2 mol/l, pH 9,5. Varování. Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Zamezte vdechování výparů.

Alkalický roztok FRV (kat. č. 862-10ML)

Základní roztok Fast Red Violet LB, 5 mg/ml, v kyselině chlorovodíkové, 0,4 mol/l, se stabilizátorem. Varování. Zdraví škodlivý při požití.

Alkalický roztok FBB (kat. č. 863-10ML)

Základní roztok Fast Blue BB, 5 mg/ml, C.I. 37175, v kyselině chlorovodíkové, 0,4 mol/l, se stabilizátorem

Roztok dusitanu sodného (kat. č. 914-10ML)

Dusitan sodný, 0,1 mol/l

Roztok citrátů (kat. č. 915-50ML)

Kyselina citronová, 18 mmol/l, citronan sodný, 9 mmol/l, chlorid sodný, 12 mmol/l, s povrchově aktivní látkou, pufováno na pH 3,6

Roztok hematoxylinu podle Gilla č. 3 (kat. č. GHS3-50ML)

Hematoxylin, certifikovaný, 6,0 g/l, C.I. 75290, jodičnan sodný, 0,6 g/l, a síran hlinitý, 52,8 g/l, se stabilizátory. Nebezpečí. Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje vážné poškození očí. Používejte ochranné rukavice / ochranné brýle / obličejový štít.

Neutrální červený roztok, pufovaný (kat. č. N6264-50ML)

Neutrální červená, certifikovaná, 0,5% m/v, C.I. 50040, v acetátovém pufru, pH 5,2. Konzervační přísada přidána.

Potřebné speciální materiály, které nejsou součástí dodávky

- Aceton, ACS činidlo
- Formaldehyd, 37% ACS

Skladování a stabilita

Uchovávejte alkalický roztok naftolu AS-BI, alkalický roztok FRV, alkalický roztok FBB a roztok dusitanu sodného v chladničce (2–8 °C). Činidla jsou stabilní do data spotřeby. Uchovávejte roztok citrátů v chladničce (2–8 °C). Roztok je vhodný pro použití, pokud nedochází k mikrobiálnímu růstu.

Uchovávejte roztok hematoxylinu a neutrální červený roztok při pokojové teplotě (18–26 °C). Chraňte roztok hematoxylinu před světlem. Činidla jsou stabilní do data spotřeby.

Znehodnocení

Pokud roztok hematoxylinu zhnědne (nadměrně oksyložený ze vzduchu) nebo zřalovi (ztráta kyselosti), zlikvidujte jej.

Příprava

Činidla jsou dodávána připravená k použití.

Fixační prostředek citrát-aceton-formaldehyd: Do 25 ml roztoku citrátů, kat. č. 915-50ML, přidejte 65 ml acetonu a 8 ml 37% formaldehydu. Vložte do skleněné lahvičky a pevně uzavřete. Uchovávejte v chladničce (2–8 °C). Před použitím zahřejte na 18–26 °C. Stabilní až 4 týdny, pokud je uchováván pevně uzavřený v chladničce.

Bezpečnostní opatření

Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pro diagnostické použití in vitro v klinickém laboratorním prostředí. Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pouze pro profesionální použití kvalifikovaným personálem. Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro Sigma-Aldrich mohou být používány laboratorními pracovníky, kteří jsou vyškoleni k manipulaci s lidskými vzorky, které mohou být infekční, k používání mikroskopů a jiného laboratorního vybavení a jejich barevné vidění a ostrost zraku jsou dostatečné pro rozlišení barev a různých objektů pod mikroskopem.

Při zacházení s laboratorními činidly dodržujte běžná bezpečnostní opatření. Odpad zlikvidujte podle všech místních, regionálních či národních předpisů.

Postup

Odběr vzorků

Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout naprosté ujištění, že vzorky krve nebo tkáně nebudou zdrojem infekce. Všechny krevní deriváty nebo vzorky tkáně je proto nutné považovat za potenciálně infekční.

Lze použít čerstvé nátěry nebo vzorky krve nebo kostní dřeně antikoagulované heparinem.⁵ VYHÝBEJTE SE EDTA.⁵ Krevní nátěry by měly být obarveny pro zkoumání enzymatické aktivity do 8 hodin od přípravy. Pokud to však není možné, může být postupná ztráta aktivity alkalické fosfatázy zpožděna fixací a uložením přes noc do mrazničky.⁵ Nátěry by měly být vysušeny nejméně 1 hodinu před fixací a 3 hodiny po fixaci před zmrazením.

Poznámky

Provedte postup s použitím pozitivních kontrol. Ty lze získat od pacientů s pyogenní leukocytózou nebo od žen ve třetím trimestru těhotenství nebo během prvních několika dnů po porodu. Skóre alkalické fosfatázy leukocytů u těchto osob obvykle přesahuje 100. Negativní kontrolu lze připravit z normálního fixovaného nátěru ponořením do vroucí vody po dobu 1 minuty, aby se enzym deaktivoval. Kontrolní nátěry lze uchovávat až 1 rok, pokud jsou skladovány fixované, zabalené v obalu Parafilm® při teplotě –70 °C. Nátěry by měly být vysušeny nejméně 1 hodinu před fixací a 3 hodiny po fixaci před zmrazením.

Důrazně se doporučuje, aby si každá laboratoř stanovila vlastní očekávaný rozsah charakteristický pro místní populaci.

Postup závisí na subjektivním hodnocení zbarvených buněk. Výsledkem může být široká variabilita získaných hodnocení. Teplota reakční směsi musí být udržována v rozmezí 18–26 °C. Nižší teploty budou mít za následek výrazně nižší skóre. Při teplotě nad 30 °C dojde k výraznému zvýšení aktivity. Eozinofily se nezbavují, ale lze je rozpoznat podle dvoulaločných jader a velkých refraktilních granulí.

Údaje o látkách, které mohou interferovat s aktivitou alkalické fosfatázy leukocytů (LAPA), jsou omezené. O některých lécích a dalších látkách je známo, že ovlivňují aktivitu alkalické fosfatázy v krevním oběhu.⁶ Perorální antikoncepce, kortizol a stres mohou vést ke zvýšenému skóre alkalické fosfatázy leukocytů.³

U lidí je aktivita alkalické fosfatázy omezena na nezralé a zralé granulocyty. V lymfocytech může být občas pozorováno slabé zbarvení. Osteoblasty kostní dřeně a endotelální buňky se barví silně.

Postup

POZNÁMKA: Pro použití s nádobami Columbia vydělte objemy činidla 5.

1. Odměřte 45 ml deionizované vody a upravte teplotu na 18–26 °C.
2. Připravte roztok diazoniové soli:
Přidejte 1 ml roztoku dusitanu sodného do 1 ml alkalického roztoku FRV NEBO
přidejte 1 ml roztoku dusitanu sodného do 1 ml alkalického roztoku FBB. Zamíchejte jemným překlápěním. Nechte 2 minuty odstát.
3. Přidejte roztok připravený v kroku 2 do deionizované vody z kroku 1.
4. Do zředěného roztoku diazoniové soli (krok 3) přidejte 1 ml alkalického roztoku naftolu AS-BI. Dobře promíchejte a nalijte do Coplinovy nádoby.
5. Přidejte fixační prostředek citrát-aceton-formaldehyd na pokojovou teplotu (18–26 °C). Zafixujte sklička ponořením do fixačního roztoku na 30 sekund. Jemně oplachujte v deionizované vodě po dobu 45 sekund. Nedovolte, aby sklička vyschla.
6. Přidejte sklička do směsi alkalických barviv (krok 4) a inkubujte 15 minut při teplotě 18–26 °C. Ponořená sklička chraňte před přímým světlem. Směs alkalických barviv po použití zlikvidujte.
7. Po 15 minutách inkubace vyjměte sklička z Coplinovy nádoby a 2 minuty oplachujte v deionizované vodě. Nedovolte, aby sklička vyschla.
8. Kontrastně barvěte po dobu 2 minut. Pokud používáte alkalický roztok FRV, proveďte kontrastní barvení roztokem hematoxylinu podle Gilla č. 3. Pokud používáte alkalický roztok FBB, proveďte kontrastní barvení pufovaným neutrálním červeným roztokem.
9. Důkladně opláchněte sklička vodou z vodovodu a vysušte na vzduchu.
10. Mikroskopicky vyhodnoťte. Pokud je vyžadováno krycí skličko, používejte pouze vodné montážní médium.

Pracovní charakteristiky

Metoda hodnocení

Prohlédněte si nátěr (900X) a vyberte tenkou oblast, kde se erytrocyty sotva dotýkají. Místa aktivity fosfatázy se objeví jako modré nebo červené granule v závislosti na použitém barvivu. Vyberte 100 po sobě jdoucích neutrofilních granulocytů ve stádiu tyčky a segmentu. Ohodnoťte je body od 0 do 4+ na základě množství a intenzity vysrážené barviva v cytoplazmě těchto buněk. Charakteristiky hodnocení jsou uvedeny v tabulce 1. Součet hodnocení 100 buněk je považován za skóre.

Tabulka 1. Charakteristiky hodnocení*

Vysrážené azobarvivo v cytoplazmě				Pozadí cytoplazmy
Hodnocení buněk	Množství** (%)	Velikost granulí	Intenzita barvení	
0+	Žádné	–	Žádné	Žádné
1+	50	Malé	Slabé až střední	Bezbarvé až velmi světlé růžové nebo modré
2+	50–80	Malé	Střední až silné	Bezbarvé až světlé růžové nebo modré
3+	80–100	Střední až velké	Silné	Bezbarvé až růžové nebo modré
4+	100	Střední až velké	Brilantní	Není viditelné

* Tabulka 1 představuje úpravu pozorování provedenou Kaplowem.^{2,3}

** Procento objemu cytoplazmy obsazené sraženinou azobarviva.

Aby bylo možné získat skóre aktivity alkalické fosfatázy leukocytů (LAPA), vynásobí se počet započítaných buněk hodnotou pro hodnocení buněk. Tyto hodnoty se sečtou a získá se skóre LAPA, jak je znázorněno v následujících příkladech:

Hodnocení buněk	Vypočítané skóre	Skóre LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Celkem	100	67

Následující skóre od 40 zdravých jedinců byla změřena ve společnosti Sigma-Aldrich popsaným postupem.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Průměr LAPA ± 1SD	76 ± 31	94 ± 39
Rozsah LAPA	44-106	55-133

Rozsah normálních skóre je široký, pohybuje se od 20 do 180. U těchto 40 normálních jedinců byl získán následující rozsah skóre:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20–146	25–180

Pokud se pozorované výsledky liší od očekávaných výsledků, obraťte se na technický servis společnosti Sigma-Aldrich.

Analytické pracovní charakteristiky

Analytické výsledky daných testů provedených na všech cílových strukturách potvrzují 100% citlivost, specifčnost a opakovatelnost.

Kat. č.	Popis produktu	Cíl	Specifičnost v rámci testu	Citlivost v rámci testu	Specifičnost mezi testy	Citlivost mezi testy
861	Alkalický roztok naftolu AS-BI	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
862	Alkalický roztok FRV	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
863	Alkalický roztok FBB	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
914	Roztok dusitanu sodného	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
915	Roztok citrátů	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
GHS3	Roztok hematoxylinu podle Gilla č. 3	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
N6264	Neutrální červený roztok, pufovaný	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3

Varování a nebezpečí

Aktuální informace o rizicích, nebezpečích a bezpečnosti si přečtěte v bezpečnostním listu a na označení výrobku.

86C:



H290 Může být korozivní pro kovy.

H302 Zdraví škodlivý při požití.

H315 Dráždí kůži.

H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H319 Způsobuje vážné podráždění očí.

H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest.

H411 Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

P234 Uchovávejte pouze v původním obalu.

P273 Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

P280 Používejte ochranné rukavice / ochranné brýle / obličejový štít.

P301 + P312 PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302 + P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.

P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

86R:



H290 Může být korozivní pro kovy.

H302 Zdraví škodlivý při požití.

H315 Dráždí kůži.

H318 Způsobuje vážné poškození očí.

H373 Může způsobit poškození orgánů (ledviny) při prodloužené nebo opakované expozici při požití.

P234 Uchovávejte pouze v původním obalu.

P280 Používejte ochranné rukavice / ochranné brýle / obličejový štít.

P301 + P312 PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302 + P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.

P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P314 Necítíte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné nežádoucí příhodě, nahlaste to výrobcí a/nebo jeho autorizovanému zástupci a vašemu národnímu úřadu.

Definice symbolů

Symbody definované v normě EN ISO 15223-1:2021

	Výrobce		Katalogové číslo
	Přečtěte si Návod k použití		Kód šarže
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii		Prohlášení o shodě s předpisy Evropské unie (podle definice v IVDR 2017/746)
	Datum spotřeby		Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Teplotní limit		Upozornění
	Datum výroby		Dovozce
	Označuje autorizovaného zástupce ve Švýcarsku		

Reference

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Kontaktní informace

Chcete-li podat objednávku, navštivte naše webové stránky na [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Technický servis naleznete na stránkách technického servisu na naší webové stránce [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historie revizí

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
	Přeneseno do nové šablony s aktuálním značením. Určeno pro profesionální použití v rámci určeného použití a bezpečnostních opatření. Revidované určené použití k dosažení souladu s pokyny IVDR. Aktualizovaný bezpečnostní list materiálu k bezpečnostnímu listu. Aktualizované kontaktní informace. Odstraněn pokyn k dodržení CLSI pro odběr vzorků. Odstraněna norma EN 980 a změněna na normu EN ISO 15223-1:2021 pro symboly. Přidány kontaktní informace pro případ nežádoucí události. Přidána tabulka historie revizí. Přidána varování a nebezpečí. Přidány informace o zástupci ve Švýcarsku.
Rev. 6.0	2024
	Opraveno číslo interního dokumentu.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Počáteční M a Sigma-Aldrich jsou ochranné známky společnosti Merck KGaA, Darmstadt, Německo nebo jejich přidružených společností. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách jsou k dispozici prostřednictvím veřejně přístupných zdrojů.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Bruksanvisning

Leukocytt alkalisk fosfatase-sett

Prosedyre nr. 86



Tiltentkt bruk

Sigma-Aldrich alkalisk fosfatase-sett er ment å være en generell histologisk fargeløsning for bruk i et laboratorium. Alkaliske fosfataser reagenser er bare for profesjonell «in vitro-diagnostisk bruk». Denne manuelle, kvantitative og histokjemiske prosedyren demonstrerer alkalisk fosfatase-aktivitet i leukocytt- eller benmargsfilmer fra mennesker. Histologisk visualisering av leukocytt forbundet alkaline phosphatase er en unik teknikk som ofte brukes innen medisin.

I hematopoetisk vev ser alkalisk fosfatase ut til å være begrenset til bånd- og segmenterte nøytrifiler.^{1,2} Påvisningen ved samtidig innfanging ved bruk av substituerte naftoler og diazoniumsalter er kanskje det tidligste eksemplet på en cytokjemisk enzymtest med klinisk betydning.³

De fleste prosedyrer, inkludert de fra Sigma-Aldrich, benytter stabile diazoniumsalter. Disse dannes ved å reagere et ariamin med natriumnitritt i et surt medium.⁴ Det resulterende diazoniumklorid (som regel ustabil) kan deretter behandles med forbindelser som sinkklorid, sinksulfat eller naftalen-1,6-disulfonat, som danner stabile salter. Disse stabilisatorene kan utøve markert hemming på enkelte enzymsystemer, mens diazoniumkloridene er mindre hemmende.⁴ Av denne grunn tilbyr Sigma-Aldrich nå stabile løsninger av Fast Red Violet LB-base, Fast Blue BB-base og natriumnitritt for alkalisk fosfatase-cytokjemi. For å forenkle disse metodene ytterligere inngår en stabil løsning med naftol-AS-BI-fosfat.

For å utføre testen inkuberes fikserte blodfilmer i romtemperatur (18–26 °C) i en løsning som inneholder naftol-AS-BI-fosfat og ferskt fremstilt Fast Red Violet LB-salt eller Fast Blue BB-salt bufret ved pH 9,5 med 2-amino-2-metyl-1,3-propanol (AMPD). Steder med aktivitet er enten røde eller blå, avhengig av valget av diazoniumsalt. Prosedyren som inkluderer Fast Red Violet LB ligner på en foreslått NCCLS-referansemetode.⁵

Reagenser

Alkalisk naftol-AS-BI-løsning (kat.nr. 861-10ML)

Naftol-AS-BI-fosfat, 4 mg/ml, i AMPD-buffer, 2 mol/l, pH 9,5. Advarsel. Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Kan forårsake irritasjon av luftveiene. Unngå innånding av damp.

Alkalisk FRV-løsning (kat.nr. 862-10ML)

Fast Red Violet LB-base, 5 mg/ml, i saltsyre, 0,4 mol/l, med stabiliseringsmiddel. Advarsel. Farlig ved svelging.

Alkalisk FBB-løsning (kat.nr. 863-10ML)

Fast Blue BB-base, 5 mg/ml, C.I. 37175, i saltsyre, 0,4 mol/l, med stabiliseringsmiddel

Natriumnitrittløsning (kat.nr. 914-10ML)

Natriumnitritt, 0,1 mol/l

Sitratløsning (kat.nr. 915-50ML)

Sitronsyre, 18 mmol/l, natriumsitrat, 9 mmol/l, natriumklorid, 12 mmol/l, med overflateaktivt middel, bufret ved pH 3,6

Hematoksylinløsning, Gill-nr. 3 (kat.nr. GHS3-50ML)

Hematoksylin, sertifisert, 6,0 g/l, C.I. 75290, natriumjodat, 0,6 g/l, og aluminiumsulfat, 52,8 g/l, med stabiliseringsmidler. Fare. Farlig ved svelging. Gir alvorlig øyeskade. Benytt vernehansker/ øyevern/ansiktsvern.

Nøytral rød løsning, bufret (kat.nr. N6264-50ML)

Nøytral rød, sertifisert, 0,5 % vekt/volum, C.I. 50040, i acetatbuffer, pH 5,2. Tilsatt konserveringsmiddel.

Spesielle materialer som kreves, men som ikke medfølger

- Aceton, ACS-reagens
- Formaldehyd, 37 % ACS

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar alkalisk naftol-AS-BI-løsning, alkalisk FRV-løsning, alkalisk FBB-løsning og natriumnitrittløsning i kjøleskap (2–8 °C). Reagenser er stabile frem til utløpsdatoen. Oppbevar sitratløsning i kjøleskap (2–8 °C). Løsningen er egnet for bruk ved fravær av mikrobiell vekst.

Oppbevar hematoksylinløsning og nøytral rød løsning i romtemperatur (18–26 °C). Beskytt hematoksylinløsningen mot lys. Reagenser er stabile frem til utløpsdatoen.

Forringelse

Kast hematoksylinløsning hvis løsningen blir brun (overoksidert fra luft) eller lilla (tap av surhet).

Klargjøring

Reagenser leveres klare til bruk.

Fikseringsmiddel med sitrat-aceton-formaldehyd: Tilsett 65 ml aceton og 8 ml 37 % formaldehyd i 25 ml sitratløsning, kat.nr. 915-50ML. Plasser i en glassflaske, og lukk godt igjen. Oppbevares i kjøleskap (2–8 °C). Varm opp til 18–26 °C for bruk. Stabil i opptil 4 uker ved oppbevaring godt lukket i kjøleskap.

Forsiktighetsregler

Disse IVD-ene er tiltentkt bruk in vitro-diagnostisk bruk i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD-ene er kun for profesjonell bruk av kvalifisert personell. Sigma-Aldrich-IVD-er kan betjenes av laboratoriepersonell som er opplært i å håndtere humane prøver som kan være smittsomme, bruke

mikroskoper og annet laboratorieutstyr, og som har fargeoppfatning og synsskarphet for å skille farger og andre elementer under et mikroskop.

Normale forsiktighetsregler for håndtering av laboratoriereagenser bør følges. Avfall må kastes i samsvar med alle lokale, statlige, provinsielle eller nasjonale forskrifter.

Prosedyre

Prøvetaking

Ingen kjent testmetode kan fullt ut forsikre at blodprøver eller vev ikke utgjør en smittefare. Alle blodderivater eller vevsprøver bør derfor betraktes som potensielt smittefarlige.

Ferske blod- eller benmargsfilmer eller prøver som er antikoagulert med heparin kan brukes.⁵ UNNGÅ EDTA.⁵ Blodutstryk skal farges for enzymaktivitet innen 8 timer etter fremstilling. Hvis dette ikke er mulig, kan det gradvise tapet av alkalisk fosfatase-aktivitet forsinkes ved hjelp av fiksering og oppbevaring over natten i fryseren.⁵ Filmer skal tørkes minst 1 time før fiksering og 3 timer etter fiksering før nedfrysing.

Merknader

Utfør prosedyren ved bruk av positive kontroller. Disse kan hentes fra pasienter med pyogen leukocytose eller hos gravide kvinner i tredje trimester eller de første dagene etter fødselen. Skår av alkalisk fosfatase i leukocytt fra disse personene er som regel over 100. En negativ kontroll kan fremstilles fra et vanlig fiksert utstryk ved å dype den i kokende vann i 1 minutt for å inaktivere enzymet. Kontrollfilmer kan bevares i opptil 1 år hvis de oppbevares fiksert og pakket i Parafilm® ved –70 °C. Disse filmene bør tørkes minst 1 time før fiksering og 3 timer etter fiksering før frysing.

Det anbefales sterkt at hvert laboratorium oppretter sitt eget forventede område som er karakteristisk for den lokale populasjonen.

Prosedyren avhenger av subjektiv vurdering av fargede celler. Dette kan resultere i at svært ulike variasjoner oppnås. Temperaturen på reaksjonsblandingen må holdes mellom 18–26 °C. Lavere temperaturer vil resultere i betydelig lavere skår. Over 30 °C øker aktiviteten betydelig. Eosinofiler farges ikke, men kan gjenkjennes av lappedelte kjerner og store refraktile granuler.

Det finnes lite data på forbindelser som kan forstyrre aktiviteten av alkalisk fosfatase i leukocytt (LAPA). Visse legemidler og andre stoffer er kjent for å påvirke aktiviteten av sirkulerende alkalisk fosfatase.⁶ P-piller, kortisol og stress kan øke skårene av alkalisk fosfatase i leukocytt.³

Hos mennesker er aktiviteten av alkalisk fosfatase begrenset til modne og båndformede granulocytt. Noen ganger kan svak farging observeres i lymfocytt. Benmargsteoblaster og endotelceller farges kraftig.

Prosedyre

MERK: For bruk med Columbia-glass deles reagensvolumene med 5.

1. Mål opp 45 ml avionisert vann, og juster temperaturen til 18–26 °C.
2. Fremstill diazoniumsaltløsning:
Tilsett 1 ml natriumnitrittløsning i 1 ml alkalisk FRV-løsning
ELLER
tilsett 1 ml natriumnitrittløsning i 1 ml alkalisk FBB-løsning. Bland ved å snu opp ned varsomt. La stå i 2 minutter.
3. Tilsett løsning fremstilt i trinn 2 i det avioniserte vannet fra trinn 1.
4. Tilsett 1 ml alkalisk naftol-AS-BI-løsning i fortyntet diazoniumsaltløsning (trinn 3). Bland godt, og hell i en Coplin-beholder.
5. Romtemper (18–26 °C) sitrat-aceton-formaldehyd-fikseringsmidlet. Fikser objektglass ved å senke dem ned i fikseringsløsning i 30 sekunder. Skyll varsomt i avionisert vann i 45 sekunder. Objektglassene skal ikke lufttørkes.
6. Plasser objektglassene i alkalisk fargestoffblanding (trinn 4), og inkuber ved 18–26 °C i 15 minutter. Bløtlagte objektglass skal beskyttes mot direkte lys. Kasser den alkaliske fargestoffblandingen etter bruk.
7. Etter 15 minutters inkubasjon skal objektglassene fjernes fra Coplin-beholderen og skylles i 2 minutter i avionisert vann. Objektglassene skal ikke lufttørkes.
8. Utfør kontrastfarging i 2 minutter. Hvis du bruker alkalisk FRV-løsning, må du kontrastfarge med hematoksylinløsning, Gill-nr. 3. Hvis du bruker alkalisk FBB-løsning, må du kontrastfarge med nøytral rød løsning, bufret.
9. Skyll objektglassene grundig i vann fra springen, og lufttørk.
10. Evaluer mikroskopisk. Hvis dekkglass kreves, må du kun bruke et vannholdig monteringsmedium.

Ytelsesegenskaper

Skåringsmetode

Skann filmen (900X), og velg et tynt område der erytrocytt så vidt berører hverandre. Steder med fosfataseaktivitet vises som blå eller røde granuler, avhengig av fargestoffet som brukes. Velg 100 påfølgende segmenterte og båndformede nøytrifile granulocytt. Gi vurdering fra 0 til 4+ på grunnlag av mengde og intensitet av utfelt fargestoff i cytoplasmaet til disse cellene. Se tabell 1 for skåringssegenskaper. Summen av vurderinger fra 100 celler anses som skåren.

Tabell 1. Skåringssegenskaper*

Utfelt azofargestoff i cytoplasma				Bakgrunn for cytoplasma
Cellevurdering	Mengde** (%)	Granulørrelse	Fargeintensitet	
0+	Ingen	-	Ingen	Ingen
1+	50	Liten	Svak til moderat	Fargelos til svært lys rosa eller blå
2+	50–80	Liten	Moderat til sterk	Fargelos til lys rosa eller blå
3+	80–100	Middels til stor	Sterk	Fargelos til rosa eller blå
4+	100	Middels til stor	Strålende	Usynlig

* Tabell 1 representerer endring av observasjoner gjort av Kaplow.^{2,3}

** Prosentandel cytoplasmavolum som er okkupert av azofargestoffutfelling.

For å oppnå skår for alkalisk fosfatase-aktivitet i leukocytter (LAPA) multipliseres antallet celler med verdien for cellevurdering. Disse tallene legges til for å oppnå LAPA-skår som vist i følgende eksempler:

Cellevurdering	Skår etter telling	LAPA-skår
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totalt	100	67

Følgende skår fra 40 friske individer ble oppnådd med Sigma-Aldrich ved bruk av den beskrevne prosedyren.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA-gjennomsnitt ± 1SD	76 ± 31	94 ± 39
LAPA-område	44–106	55–133

Utvalget av normale skårer er bredt, og varierer fra 20 til 180. Følgende skårområde ble oppnådd fra disse 40 normale personene:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20–146	25–180

Hvis observerte resultater avviker fra forventede resultater, kontakt Sigma-Aldrichs tekniske service for å få hjelp.

Analytiske ytelsesegenskaper

De analytiske ytelsesresultatene for de gitte testene som ble utført på alle målstrukturer, bekrefter 100 % følsomhet, spesifisitet og repeterbarhet.

Kat. nr.	Produktbeskrivelse	Mål	Spesifisitet innen analyse	Følsomhet innen analyse	Spesifisitet mellom analyser	Følsomhet mellom analyser
861	Alkalisk naftol-AS-BI-løsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
862	Alkalisk FRV-løsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
863	Alkalisk FBB-løsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
914	Natriumnitrittløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
915	Sitratløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
GHS3	Hematoksylinløsning, Gill-nr. 3	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
N6264	Nøytral rød løsning, bufret	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Advarsler og farer

Se sikkerhetsdatablad og produktmerking for oppdatert risiko-, fare- eller sikkerhetsinformasjon.

86C:



- H290 Kan være etsende for metaller.
- H302 Farlig ved svelging.
- H315 Irriterer huden.
- H317 Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
- H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.
- H335 Kan forårsake irritasjon av luftveiene.
- H411 Giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.
- P234 Oppbevares bare i originalemballasjen.
- P273 Unngå utslipp til miljøet.
- P280 Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern.
- P301 + P312 VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege ved ubehag.
- P302 + P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.
- P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skylling.

86R:



- H290 Kan være etsende for metaller.
- H302 Farlig ved svelging.
- H315 Irriterer huden.
- H318 Gir alvorlig øyeskade.

- H373 Kan forårsake organskader (nyrer) ved langvarig eller gjentatt eksponering.
- P234 Oppbevares bare i originalemballasjen.
- P280 Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern.
- P301 + P312 VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege ved ubehag.
- P302 + P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.
- P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skylling.
- P314 Søk legehjelp ved ubehag.

Hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av denne enheten eller som et resultat av bruken, må det rapporteres til produsenten og/eller produsentens autoriserte representant og til den nasjonale myndigheten.

Symbolforklaring

Symboler som definert i EN ISO 15223-1:2021

	Produsent		Katalognummer
	Se bruksanvisning		Batchkode
	Autorisert representant i Det europeiske fellesskap / EU		EU-samsvarserklæring (definert i IVDR 2017/746)
	Best før-dato		In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr
	Temperaturgrense		Forsiktighetsregel
	Produksjonsdato		Importør
	Angir den autoriserte representanten i Sveits		

Referanser

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, s. 88–113
- Foreslått standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS: Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Kontaktinformasjon

Bestillinger kan legges inn via nettstedet vårt på [SigmaAldrich.com](#). Besøk siden for tekniske tjenester på nettstedet vårt på [SigmaAldrich.com/techservice](#) for teknisk service.

Revisjonshistorikk

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Overførte til ny mal med gjeldende varemerke. Spesifiserte at utstyret er for profesjonell bruk, i tiltenkt bruk og forsiktighetsregler. Reviderte tiltenkt bruk for å overholde IVDR-retningslinjer. Oppdaterte materialsikkerhetsdatablad til sikkerhetsdatablad. Oppdaterte kontaktinformasjon. Fjernet instruksjon om å følge CLSI for prøvetaking. Fjernet EN 980 og endret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. La til kontaktinformasjon for bivirkninger. La til en tabell med revisjonshistorikk. Tillegg av advarsler og farer. Tillegg av CH-REP-informasjon.	
Rev. 6.0	2024
Korrigert internt dokumentnummer.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initialen M og Sigma-Aldrich er varemerker for Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dets tilknyttede selskaper. Alle andre varemerker tilhører de respektive eierne. Detaljert informasjon om varemerker er tilgjengelig via offentlig tilgjengelige ressurser.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Kullanma Talimatı

Lökosit Alkalın Fosfataz Kiti

Prosedür No. 86

IVD

CE

MERCK

Kullanım Amacı

Sigma-Aldrich Alkalın Fosfataz kitleri genel laboratuvar kullanımı için histolojik boya olarak tasarlanmıştır. Alkalın Fosfataz reaktifleri yalnızca profesyonel "In Vitro Tanı Amaçlı Kullanım" içindir. Bu manuel, kalitatif, sitokimyasal prosedür, insan kanı veya kemik iliği filmlerinin lökositlerinde, alkalın fosfataz aktivitesini gösterir. Lökositle bağlantılı alkalın fosfatazın histolojik olarak görseleştirilmesi, şu anda tipta yaygın olarak kullanılan benzersiz bir tekniktir.

Hematopoietik dokuda alkalın fosfataz, bant ve segmentli nötrofillerle sınırlı kalmaktadır.^{1,2} İkame edilmiş naftoller ve diazonyum tuzları kullanılarak eşzamanlı yakalama ile gösterilmesi, belki de klinik önemi olan bir sitokimyasal enzim testinin en eski örneğidir.³

Sigma-Aldrich tarafından sağlananlar da dahil olmak üzere çoğu prosedürde stabil diazonyum tuzları kullanılır. Bunlar, bir asit ortamında arilamin ile sodyum nitritin reaksiyona sokulmasıyla oluşturulur.⁴ Ortaya çıkan diazonyum klorür (genellikle instabil), daha sonra stabil tuzlar oluşturan çinko klorür, çinko sülfat veya naftalin-1,6-disülfonat gibi bileşiklerle işlenebilir. Bu stabilizatörler bazı enzimatik sistemler üzerinde belirgin inhibisyon uygulayabilirken, diazonyum klorürler daha az inhibitördür.⁴ Bu nedenle, Sigma-Aldrich artık alkalın fosfataz sitokimyası için hızlı kırmızı viyole LB bazı, hızlı mavi BB bazı ve sodyum nitritten oluşan kararlı çözeltiler sağlamaktadır. Bu yöntemleri daha da basitleştirmek için, stabil bir naftol AS-BI fosfat dahil edilmiştir.

Testi gerçekleştirmek için fiksasyon uygulanmış kan filmleri, oda sıcaklığında (18–26°C) naftol AS-BI fosfat ve yeni hazırlanmış hızlı kırmızı viyole LB tuzu veya 2-amino-2-metil-1,3-propanediol AMPD ile pH 9,5'te tamponlanmış hızlı mavi BB tuzu içeren bir çözelti içinde inkübe edilir. Aktivite bölgeleri, diazonyum tuzu seçimine bağlı olarak kırmızı veya mavidir. Hızlı kırmızı viyole LB'yi içeren prosedür, önerilen bir NCCLS referans yöntemine benzer.⁵

Reaktifler

Naftol AS-BI Alkalın Çözeltisi (Kat. No. 861-10ML)

Naftol AS-BI fosfat, 4 mg/mL, AMPD tamponu içinde, 2 mol/L, pH 9,5. Uyarı: Cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz tahrişine neden olur. Solunum tahrişine neden olabilir. Buharını solumayın.

FRV-Alkalın Çözeltisi (Kat. No. 862-10ML)

Hızlı kırmızı viyole LB bazı, 5 mg/mL, hidroklorik asit içinde, 0,4 mol/L, stabilizatör ile. Uyarı: Yutulması halinde zararlıdır.

FBB-Alkalın Çözeltisi (Kat. No. 863-10ML)

Hızlı Mavi BB Baz, 5 mg/mL, C.I. 37175, hidroklorik asit içinde, 0,4 mol/L, stabilizatörler ile

Sodyum Nitrit Çözeltisi (Kat. No. 914-10ML)

Sodyum nitrit, 0,1 mol/L

Sitrat Çözeltisi (Kat. No. 915-50ML)

Sitrik asit, 18 mmol/L, sodyum sitrat, 9 mmol/L, sodyum klorür, 12 mmol/L sürfaktan ile, pH 3,6'de tamponlanmıştır.

Hematoksilen Çözeltisi, Gill No. 3 (Kat. No. GHS3-50ML)

Hematoksilen, sertifikalı, 6,0 g/L, C.I. 75290, sodyum iyodat, 0,6 g/L ve alüminyum sülfat, 52,8 g/L, stabilizatörler ile. Tehlike: Yutulması halinde zararlıdır. Ciddi göz hasarına neden olur. Koruyucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

Nötr Kırmızı Çözelti, Tamponlu (Kat. No. N6264-50ML)

Nötr kırmızı, sertifikalı, %0,5 a/h, C.I. 50040, asetat tamponu içinde, pH 5,2. Koruyucu eklendi.

Sağlanmayan Gerekli Özel Malzemeler

- Aseton, ACS Reaktif
- Formaldehit, %37 ACS

Saklama ve Stabilite

Naftol AS-BI Alkalın Çözeltisi, FRV-Alkalın Çözeltisi, FBB-Alkalın Çözeltisi ve Sodyum Nitrit Çözeltisini buzdolabında (2–8°C) saklayın. Reaktifler, son kullanma tarihine kadar stabildir. Sitrat Çözeltisini buzdolabında (2–8°C) saklayın. Çözelti, görünür mikrobiyal büyümenin olmadığı durumlarda kullanıma uygundur.

Hematoksilen Çözeltisi ve Nötr Kırmızı Çözeltiyi oda sıcaklığında (18–26°C) saklayın. Hematoksislen Çözeltiyi ışıktan koruyun. Reaktifler, son kullanma tarihine kadar stabildir.

Bozulma

Çözelti kahverengiyeye dönerse (havadan aşırı oksitlenme) veya mora dönerse (asidite kaybı) Hematoksislen Çözeltiyi atın.

Hazırlama

Reaktifler kullanıma hazır olarak sağlanır.

Sitrat-Aseton-Formaldehit Fiksatif: 25 mL Sitrat Çözeltisine, Kat. No 915-50ML, 65 mL Aseton, ve 8 mL %37 Formaldehit ekleyin. Cam şişeye koyun ve ağzını sıkıca kapatın. Buzdolabında saklayın (2–8°C). Kullanmadan önce 18–26°C'ye ısıtın. Ağzı sıkıca kapalı olarak buzdolabında saklanırsa 4 haftaya kadar stabildir.

Önemler

Bu IVD'ler, klinik laboratuvar ortamında in vitro tanı amaçlı kullanıma yöneliktir. Bu IVD'ler yalnızca kalifiye personel tarafından profesyonel kullanım içindir. Sigma-Aldrich IVD'ler, bulaşıcı olabilen

insan numunelerini işlemek, mikroskop ve diğer laboratuvar ekipmanlarını kullanmak üzere eğitilmiş, renkleri ve mikroskop altında diğer nesneleri ayırt etmek için renk algısına ve görme keskinliğine sahip laboratuvar personeli tarafından kullanılabilir.

Laboratuvar reaktiflerini kullanırken uygulanan normal önlemlere uyulmalıdır. Atıkları tüm yerel, eyalet, il veya ulusal seviyedeki yönetmeliklere uygun olarak atın.

Prosedür

Numune Toplama

Bilinen hiçbir test yöntemi, kan numunelerinin veya dokunun enfeksiyon bulaştırmayacağını tam olarak garanti edemez. Bu nedenle, tüm kan türevleri veya doku numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı kabul edilmelidir.

Taze kan veya kemik iliği filmleri veya heparin ile antikoagüle edilmiş numuneler kullanılabilir.⁵ EDTA'dan UZAK DURUN.⁵ Kan smear'ları, hazırlandıktan sonra 8 saat içinde enzim aktivitesi için boyanmalıdır. Fakat bu mümkün değilse, alkalın fosfataz aktivitesinin kademeli kaybı, fiksasyon ve gece boyunca dondurucuda saklama ile geciktirilebilir.⁵ Filmler fiksasyondan en az 1 saat önce ve fiksasyondan en az 3 saat sonra dondurulmadan önce kurutulmalıdır.

Notlar

Pozitif kontroller kullanarak prosedürü gerçekleştirin. Bunlar, piyojenik lökositozu olan hastalardan veya gebeliğin üçüncü trimesterindeki veya doğumdan sonraki ilk birkaç gündeki kadınlardan elde edilebilir. Bu kişilerin lökosit alkali fosfataz skorları genellikle 100'ü geçer. Negatif kontrol, enzimi inaktive etmek için normal bir fiksasyon uygulanmış smear'ı 1 dakika kaynar suya batırarak hazırlanabilir. Kontrol filmleri, –70 C'de Parafilm®'e sarılarak fiksasyon uygulanmış şekilde muhafaza edilirse 1 yıla kadar saklanabilir. Bu filmler, fiksasyondan en az 1 saat önce ve fiksasyondan 3 saat sonra dondurulmadan önce kurutulmalıdır.

Her laboratuvarın, yerel popülasyon için karakteristik olan kendi beklenen aralığını oluşturması şiddetle tavsiye edilir.

Prosedür, boyanmış hücrelerin subjektif derecelendirmesine bağlıdır. Bu, elde edilen derecelendirmelerin geniş bir varyasyona sahip olmasına neden olabilir. Reaksiyon karışımının sıcaklığı 18–26 C arasında tutulmalıdır. Daha düşük sıcaklıklar önemli ölçüde daha düşük skorlarla sonuçlanacaktır. 30°C'nin üzerinde, aktivitede belirgin artışlar meydana gelir. Eozinofiller boyanmazlar ancak iki loblu çekirdekler ve büyük kırılğan granüller tarafından bağlanabilirler.

Lökosit alkalın fosfataz aktivitesine (LAPA) müdahale edebilecek bileşiklerle ilgili bir veri eksikliği vardır. Bazı ilaçların ve diğer maddelerin dolaşımdaki alkalın fosfataz aktivitesini etkilediği bilinmektedir.⁶ Oral kontraseptifler, kortizol ve stres lökosit alkalen fosfataz skorlarının yükselmesine neden olabilir.³

İnsanlarda alkalın fosfataz aktivitesi, olgun ve bant şeklindeki granülositlerle sınırlıdır. Nadiren lenfositlerde zayıf boyanma gözlenebilir. Kemik iliği osteoblastları ve endotel hücreleri güçlü bir şekilde boyanır.

Prosedür

NOT: Columbia kavanozlarıyla kullanmak için reaktif ölçülerini 5'e bölün.

- 45 mL deiyonize suyu hazırlayın ve sıcaklığı 18–26°C'ye ayarlayın.
- Diazonyum tuzu çözeltisini hazırlayın: 1 mL FRV--Alkalın Çözeltisine 1 mL Sodyum Nitrit Çözeltisi ekleyin. VEYA 1 mL FBB--Alkalın Çözeltisine 1 mL Sodyum Nitrit Çözeltisi ekleyin. Hafifçe ters çevirerek karıştırın. 2 dakika beklemeye bırakın.
- Adım 2'de hazırlanan çözeltiyi Adım 1'deki deiyonize suya ekleyin.
- Seyreltilmiş diazonyum tuzu çözeltisine 1 mL Naftol AS-BI Alkalın Çözeltisi ekleyin (Adım 3). İyice karıştırın ve Coplin kavanozuna dökün.
- Sitrat-Aseton-Formaldehit Fiksatifini oda sıcaklığına (18–26°C) getirin. Fiksatif çözeltiyi daldırarak lamalara 30 saniye fiksasyon uygulayın. Deiyonize suda 45 saniye hafifçe durulayın. Lamaların kurumasına izin vermeyin.
- Lamları alkalın-boya karışımına ekleyin (Adım 4) ve 18–26°C'de 15 dakika inkübe edin. Daldırılmış lamları doğrudan ışıktan koruyun. Kullandıktan sonra alkalın-boya karışımını atın.
- 15 dakikalık inkübasyondan sonra, Coplin kavanozundan lamları çıkarın ve 2 dakika deiyonize suda durulayın. Lamların kurumasına izin vermeyin.
- 2 dakika zıt boyama yapın. FRV--Alkalın Çözeltisi kullanılıyorsa, Hematoksislen Çözelti, Gill No. 3 ile zıt boyama yapın. FBB--Alkalın Çözeltisi kullanılıyorsa, Nötr Kırmızı Çözelti, Tamponlu ile zıt boyama yapın.
- Lamları musluk suyunda iyice durulayın ve kurumaya bırakın.
- Mikroskopik olarak değerlendirin. Lamel gerekiyorsa, yalnızca sulu bir yerleştirme ortamı kullanın.

Performans Özellikleri

Skorlama Yöntemi

Filmi tarayın (900X) ve eritrositlerin az temas ettiği ince bir alan seçin. Fosfataz aktivitesi bölgeleri, kullanılan boyaya bağlı olarak mavi veya kırmızı granüller olarak görünecektir. 100 ardışık segmentli ve bant şeklinde nötrofilik granülositleri seçin. Bu hücrelerin sitoplazmasında çökelen boyanın miktarı ve yoğunluğu temelinde 0 ila 4+ arasında derecelendirin. Skorlama özellikleri için Tablo 1'e bakın. 100 hücrenin derecelendirmelerinin toplamı skor olarak kabul edilir.

Tablo 1. Skorlama Özellikleri*

Sitoplazmada Çökeltilmiş Azo Boyası				
Hücre Derecelendirmesi	Miktar** (%)	Granül Boyutu	Boyama Yoğunluğu	Sitoplazmanın Arka Planı
0+	Yok	-	Yok	Yok
1+	50	Küçük	Silik ila Orta	Renksiz ila çok soluk pembe veya mavi
2+	50-80	Küçük	Orta ila Güçlü	Renksiz ila soluk pembe veya mavi
3+	80-100	Orta ila Büyük	Güçlü	Renksiz ila pembe veya mavi
4+	100	Orta ila Büyük	Parlak	Görünmüyor

* Tablo 1, Kaplow tarafından yapılan gözlemlerin modifikasyonunu temsil etmektedir.^{2, 3}

** Azo boya çökeltisinin kapladığı sitoplazma hacminin yüzdesidir.

Lökosit alkalın fosfataz aktivite (LAPA) skorunu elde etmek için hesaplanan hücre sayısı, hücre derecelendirme değeri ile çarpılır. Bu rakamlar, aşağıdaki örneklerde gösterildiği gibi LAPA skorunu elde etmek için toplanır:

Hücre Derecelendirmesi	Hesaplanan Skor	LAPA Skoru
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Toplam	100	67

Sigma-Aldrich'te açıklanan prosedür kullanılarak 40 sağlıklı kişiden aşağıdaki skorlar elde edilmiştir.

Hızlı Kırmızı Mor LB	Hızlı Mavi BB
LAPA Ortalama ±1 SD	76±31 94±39
LAPA Aralığı	44-106 55-133

Normal skorların aralığı geniştir, 20 ile 180 arasında değişir. Bu 40 normal bireyden aşağıdaki skor aralıkları elde edilmiştir:

Hızlı Kırmızı Mor LB	Hızlı Mavi BB
20-146	25-180

Gözlemlenen sonuçlar beklenen sonuçlardan farklıysa, yardım için lütfen Sigma-Aldrich Teknik Servisi ile iletişime geçin.

Analitik Performans Özellikleri

Tüm hedef yapılar üzerinde yürütülen belirli testlere ait analitik performans sonuçları %100 duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliği doğrulamaktadır.

Kat. No.	Ürün Tanımı	Hedef	Tahlil İçi Özgüllük	Tahlil İçi Duyarlılık	Tahliller Arası Özgüllük	Tahliller Arası Duyarlılık
861	Naftol AS-Bİ Alkalın Çözeltilisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
862	FRV-Alkalın Çözeltilisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
863	FBB-Alkalın Çözeltilisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
914	Sodyum Nitrit Çözeltilisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
915	Sitrat Çözeltilisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
GHS3	Hematoksilen Çözeltilisi, Gill No. 3	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
N6264	Nötr Kırmızı Çözeltili, Tamponlu	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3

Uyarılar ve Tehlikeler

Güncellenmiş herhangi bir risk, tehlike veya güvenlik bilgisi için Güvenlik Veri Formuna ve ürün etiketine bakın.

86C:



H290 Metaller için aşındırıcı olabilir.

H302 Yutulması halinde zararlıdır.

H315 Cilt tahrişine neden olur.

H317 Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir.

H319 Ciddi göz tahrişine neden olur.

H335 Solunum tahrişine neden olabilir.

H411 Sudaki yaşam için uzun süreli etkiyle toksiktir.

P234 Yalnızca orijinal ambalajının içinde saklayın.

P273 Çevreye salınmasını önleyin.

P280 Korumucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P301 + P312 YUTULMASI HALİNDE: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/ doktoru arayın.

P302 + P352 CİLTLE TEMASI HALİNDE: Bol suyla yıkayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

86R:



H290 Metaller için aşındırıcı olabilir.

H302 Yutulması halinde zararlıdır.

H315 Cilt tahrişine neden olur.

H318 Ciddi göz hasarına neden olur.

H373 Yutulması halinde uzun süreli veya tekrarlı maruziyet sonucu organlarda (böbrek) hasara neden olabilir.

P234 Yalnızca orijinal ambalajının içinde saklayın.

P280 Korumucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P301 + P312 YUTULMASI HALİNDE: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/ doktoru arayın.

P302 + P352 CİLTLE TEMASI HALİNDE: Bol suyla yıkayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

P314 Kendinizi iyi hissetmezseniz, tıbbi tavsiye/müdahale alın.

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımı sonucunda ciddi bir olay meydana gelirse, lütfen bunu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makamınıza bildirin.

Sembol Tanımları

EN ISO 15223-1:2021'de tanımlanan semboller

	Üretici		Katalog Numarası
	Kullanma Talimatına bakın		Parti Kodu
	Avrupa Topluluğu'nda/Avrupa Birliği'nde Yetkili Temsilci		Avrupa Birliği Uygunluk Beyanı (IVDR 2017/746'da tanımlanmıştır)
	Son Kullanma Tarihi		İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Sıcaklık Sınırı		Dikkat
	Üretim Tarihi		İthalatçı
	İsviçre'deki Yetkili Temsilciyi belirtir		

Referanslar

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248-250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

İletişim Bilgileri

Sipariş vermek için lütfen [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com) adresinden web sitemizi ziyaret edin. Teknik Servis için lütfen [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice) adresinden web sitemizin teknik servis sayfasını ziyaret edin.

Revizyon Geçmişi

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
	Mevcut markalama ile yeni şablona aktarıldı. Kullanım amacı ve önlemler bölümünde profesyonel kullanım amaçlı olduğu belirtildi. Kullanım amacı, IVDR yönergelerine uyumlu şekilde revize edildi. Malzeme Güvenlik Bilgi Formu, Güvenlik Bilgi Formu olarak güncellendi. İletişim bilgileri güncellendi. Numune toplama için CLS'I'yi takip etme talimatı kaldırıldı. Semboller için EN 980 kaldırıldı ve EN ISO 15223-1:2021 olarak değiştirildi. Advers olay iletişim bilgileri eklendi. Bir revizyon geçmişi tablosu eklendi. Uyarılar ve Tehlikeler eklendi. CH-REP bilgisi eklendi.
Rev. 6.0	2024
	Düzeltilmiş şirket içi belge numarası.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M ve Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Almanya veya bağlı kuruluşlarının ticari markalarıdır. Diğer tüm ticari markalar ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir. Ticari markalar hakkında ayrıntılı bilgi, herkesin erişebileceği kaynaklar aracılığıyla edinilebilir.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Käyttöohje

Leukosyyttien alkalisen fosfataasin pakkaus

Menetelmänro 86



Käyttötarkoitus

Sigma-Aldrichin alkalisen fosfataasin pakkaus on tarkoitettu histologiseen värjäykseen yleisessä laboratoriokäytössä. Alkaliset fosfataasireagenssit on tarkoitettu vain ammattikäyttöön "in vitro -diagnostiikassa." Tämä manuaalinen, kvalitatiivinen, histokemiallinen menetelmä osoittaa alkalisen fosfataasin toiminnan ihmisen veren tai luuytimen sivelyvalmistaiden leukosyyteissä. Leukosyytteihin liittyvän alkalisen fosfataasin histologinen visualisointi on ainutlaatuinen tekniikka, joka on nykytietämyksessä yleisessä käytössä.

Hematopoeettisessa kudoksessa alkalinen fosfataasi näyttää rajoittuvan sauvaumaisiin ja liuskatumaisiin neutrofiileihin.^{1,2} Sen demonstrointi samanaikaisella sieppauksella substituutujen naftolien ja diatsoniumsuolojen avulla on ehkä varhaisin esimerkki sytokemiallisesta entsyymitestistä, jolla on kliinistä merkitystä.³

Useimmissa menetelmissä, Sigma-Aldrichin menetelmät mukaan lukien, käytetään stabiileja diatsoniumsuoloja. Niitä muodostetaan aryyliamiinin ja natriumnitriitin välisellä reaktiolla happoväliaineessa.⁴ Muodostunut (yleensä epästabiili) diatsoniumkloridi voidaan tämän jälkeen käsitellä stabiileja suoloja muodostavilla yhdisteillä, kuten sinkkikloridilla, sinkkisulfaattilla tai naftaleeni-1,6-disulfonyaattilla. Nämä stabilointiaineet voivat aiheuttaa huomattavaa inhibitiota joihinkin entsyymijärjestelmiin, kun taas diatsoniumkloridit eivät ole yhtä inhibiivia.⁴ Tästä syystä Sigma-Aldrich toimittaa nyt stabiilin nopean puna-violetti-LB-pohjaliuoksen, nopean sini-BB-pohjaliuoksen ja natriumnitriittiliuoksen alkalisen fosfataasin solukemiaa varten. Menetelmien yksinkertaistamiseksi pakkaus sisältää stabiilin naftoli-AS-BI-fosfaatti-liuoksen.

Testin suorittamiseksi kiinnitetyt veren sivelyvalmistet inkuboidaan huoneenlämmössä (18–26 °C) liuoksessa, joka sisältää naftoli-AS-BI-fosfaattia ja juuri valmistettua nopeaa puna-violetti-LB-suolaa tai nopeaa sini-BB-suolaa, joka on puskuroitu pH-arvossa 9,5 2-amino-2-metyyli-1,3-propanididoli-AMPD:llä. Toiminta-alueet ovat joko punaisia tai sinisiä valitun diatsoniumsuolan mukaan. Nopeaa puna-violetti-LB:tä hyödyntävä menetelmä muistuttaa ehdotettua NCCLS-vertilumenetelmää.⁵

Reagenssit

Alkalinen naftoli-AS-BI-liuos (luettelonro 861-10ML)

Naftoli-AS-BI-fosfaatti, 4 mg/ml, AMPD-puskurissa, 2 mol/l, pH 9,5. Varoitus. Ärsyttää ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Vältä höyryn hengittämistä.

Alkalinen FRV-liuos (luettelonro 862-10ML)

Nopea puna-violetti-LB-pohja, 5 mg/ml, stabilointiainetta sisältävässä suolahapossa, 0,4 mol/l. Varoitus. Haitallista nieltynä.

Alkalinen FBB-liuos (luettelonro 863-10ML)

Nopea sini-BB-pohja, 5 mg/ml, väri-indeksi 37175, stabilointiainetta sisältävässä suolahapossa, 0,4 mol/l

Natriumnitriittiliuos (luettelonro 914-10ML)

Natriumnitriitti, 0,1 mol/l

Sitraattiliuos (luettelonro 915-50ML)

Sitruunahappo, 18 mmol/l, natriumsitraatti, 9 mmol/l, natriumkloridi, 12 mmol/l, ja pinta-aktiivinen aine, puskuroitu pH:ssa 3,6

Hematoksyliiniliuos, Gillin nro 3 (luettelonro GHS3-50ML)

Hematoksyliini, sertifioitu, 6,0 g/l, väri-indeksi 75290, natriumjodaatti, 0,6 g/l, ja alumiinisulfaatti, 52,8 g/l, sekä stabilointiaineet. Vaara. Haitallista nieltynä. Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa. Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

Neutraali punaliuos, puskuroitu (luettelonro N6264-50ML)

Neutraali puna, sertifioitu, 0,5 % w/v, väri-indeksi 50040, asetaattipuskurissa, pH 5,2. Säilöntäainetta lisäty.

Tarvittavat erityismateriaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

- Asetoni, ACS-reagenssi
- Formaldehydi, 37 %, ACS

Säilytys ja stabiilius

Säilytä alkalinen naftoli-AS-BI-liuos, alkalinen FRV-liuos, alkalinen FBB-liuos ja natriumnitriittiliuos jääkaapissa (2–8 °C). Reagenssit ovat stabiileja viimeiseen käyttöpäivään saakka. Säilytä sitraattiliuos jääkaapissa (2–8 °C). Liuos soveltuu käytettäväksi, kun mikrobikasvua ei ole.

Säilytä hematoksyliiniliuos ja neutraali punaliuos huoneenlämmössä (18–26 °C). Suojaa hematoksyliiniliuos valolta. Reagenssit ovat stabiileja viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Pilaantuminen

Hävitä hematoksyliiniliuos, jos liuos muuttuu ruskeaksi (ylioksidoitunut ilman vaikutuksesta) tai violetiksi (happamuuden häviäminen).

Valmistelu

Reagenssit toimitetaan käyttövalmiina.

Sitraatti-asetoni-formaldehydifiksatiivi: Lisää 25 ml:aan sitraattiliuosta, luettelonro 915-50ML, 65 ml asetonia ja 8 ml 37-prosenttista formaldehydiä. Laita lasipulloon ja sulje se tiiviisti. Säilytä jääkaapissa (2–8 °C). Lämmitä 18–26 °C:n lämpötilaan ennen käyttöä. Liuos on stabiili enintään neljä viikkoa, jos sitä säilytetään tiiviisti suljettuna jääkaapissa.

Varotoimet

Nämä in vitro -diagnostiset (IVD) laitteet on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa kliinisessä laboratoriympäristössä. Nämä IVD-laitteet on tarkoitettu vain pätevän ammatihenkilöstön käyttöön. In vitro -diagnostisia Sigma-Aldrich-laitteita saa käyttää laboratoriohenkilöstö, joka on koulutettu käsittelemään mahdollisesti tartuntavaarallisia ihmisperäisiä näytteitä ja käyttämään mikroskooppia ja muita laboratoriotarvikkeita ja jolla on riittävä värinäkö ja näöntarkkuus värien ja muiden kohteiden erottamiseen mikroskooppilla.

Normaaleja laboratorioreagenssien käsittelyyn liittyviä varotoimia tulee noudattaa. Hävitä jätteet kaikkien paikallisten, alueellisten ja kansallisten määräysten mukaisesti.

Menettely

Näytteenotto

Millään tunnetulla testimenetelmällä ei voida täysin taata, että veri- tai kudonsäilytteet eivät tartuttaisi infektiota. Siksi kaikkia verijohdannaisia ja kudonsäilytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuntavaarallisina.

Tuoreita veren tai luuytimen sivelyvalmistaita tai hepariiniilla antikoaguloituja näytteitä voidaan käyttää.⁵ VÄLTÄ EDTA:TA.⁵ Veren sivelynäytteet on värjättävä entsyymitoiminnan selvittämiseksi kahdeksan tunnin kuluessa valmistelusta. Jos tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, alkalisen fosfataasitoiminnan asteittaisia häviämiä voidaan viivästyttää kiinnittämällä näyte ja säilyttämällä sitä pakastimessa yön yli.⁵ Sivelyvalmistaita on kuivattava vähintään tunti ennen kiinnittämistä ja kolme tuntia kiinnittämisen jälkeen ennen jäädyttämistä.

Huomautukset

Käytä menetellessä positiivisia kontroleja. Niitä voidaan ottaa potilailta, joilla on pyogeeninen leukosytoosi, tai naisilta, jotka ovat raskauden kolmannella kolmanneksella tai synnyttäneet muutama päivä sitten. Näiden henkilöiden leukosyyttien alkalisen fosfataasin pisteet ovat yleensä yli 100. Negatiivinen kontrolli voidaan valmistaa normaalista kiinnitetystä sivelynäytteestä uottamalla se kiehuvaan veteen yhden minuutin ajaksi, jolloin entsyymi inaktivoituu. Kontrollisivelyvalmistaita voidaan säilyttää jopa vuoden ajan, jos ne säilytetään kiinnitettyinä ja Parafilm®-kääreessä –70 °C:ssa. Näitä sivelyvalmistaita on kuivattava vähintään tunti ennen kiinnittämistä ja kolme tuntia kiinnittämisen jälkeen ennen jäädyttämistä.

On erittäin suositeltavaa, että jokainen laboratorio määrittää oman odotetun alueensa, joka on ominainen paikalliselle väestölle.

Menetelmä on riippuvainen värjättyjen solujen subjektiivisesta arvioinnista. Tämä voi johtaa arvioiden laajaan vaihteluun. Reaktioseoksen lämpötila on pidettävä välillä 18–26 °C. Alhaisemmat lämpötilat johtavat huomattavasti pienempiin pisteisiin. Yli 30 °C:n lämpötilassa toiminta lisääntyy merkittävästi. Eosinofiilit eivät värjäydy, mutta ne voidaan tunnistaa kaksilohkoisista tumista ja suurista heijastavista granuloista.

Tietoa leukosyyttien alkalisen fosfataasin toimintaa (LAPA) mahdollisesti häiritsevästä yhdisteistä on niukasti. Tietyt lääkkeiden ja muiden aineiden tiedetään vaikuttavan kiertävän alkalisen fosfataasin toimintaan.⁶ Suun kautta otettavat ehkäisyvalmisteet, kortisoli ja stressi voivat johtaa suurempiin leukosyyttien alkalisen fosfataasin pisteisiin.³

Ihmisillä alkalisen fosfataasin toiminta rajoittuu kypsiin ja sauvaumaisiin granulosyytteihin. Lymfiosyyteissä voidaan joskus havaita heikkoa värjäytymistä. Luuytimen osteoblastit ja endoteelisolut värjäytyvät voimakkaasti.

Menettely

HUOMAUTUS: Columbia-astioita käytettäessä reagenssimäärät on jaettava viidellä.

- Mittaa 45 ml deionisoitua vettä ja säädä lämpötilaksi 18–26 °C.
- Valmistele diatsoniumsuolaliuos:
Lisää 1 ml natriumnitriittiliuosta 1 ml:aan alkalista FRV-liuosta
TAI
Lisää 1 ml natriumnitriittiliuosta 1 ml:aan alkalista FBB-liuosta. Sekoita kääntelemällä varovasti. Anna asettua kaksi minuuttia.
- Lisää vaiheessa 2 valmistettu liuos vaiheessa 1 valmisteltuun deionisoituun veteen.
- Lisää 1 ml alkalista naftoli-AS-BI-liuosta laimennettuun diatsoniumsuolaliuokseen (vaihe 3). Sekoita huolellisesti ja kaada Coplin-astian.
- Anna sitraatti-asetoni-formaldehydifiksatiiviin tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C). Kiinnitä objektilasit uottamalla ne fiksatiiviliuokseen 30 sekunniksi. Huuhtelee varovasti deionisoidussa vedessä 45 sekunnin ajan. Älä päästä objektilaseja kuivumaan.
- Lisää objektilaseja alkaiseen väriseokseen (vaihe 4) ja inkuboi 18–26 °C:ssa 15 minuutin ajan. Suojaa upotetut objektilasit suoralta valolta. Hävitä alkalinen väriosa käytön jälkeen.
- Kun objektilaseja on inkuboitu 15 minuuttia, ota objektilasit Coplin-astiasta ja huuhtelee kaksi minuuttia deionisoidussa vedessä. Älä päästä objektilaseja kuivumaan.
- Vastavärjää kahden minuutin ajan. Jos käytit alkalista FRV-liuosta, vastavärjää hematoksyliiniliuoksella, Gillin nro 3. Jos käytit alkalista FBB-liuosta, vastavärjää puskuroidulla neutraalilla punaliuoksella.
- Huuhtelee objektilasit huolellisesti vesijohtovedellä ja anna kuivua.
- Arvioi mikroskooppisesti. Jos peittäminen on tarpeen, käytä vain vesipohjaista petasainetta.

Suorituskykyominaisuudet

Pisteytysmenetelmä

Skannaa sivelyvalmistite (900X) ja valitse ohut alue, jossa erytrosyytit ovat hädin tuskin kosketuksessa. Fosfataasitoimintaa sisältävät alueet näkyvät sinisinä tai punaisina granuloina käytetystä väriaineesta riippuen. Valitse 100 peräkkäistä liuskatumaista ja sauvaumaista neutrofiilistä granulosyyttiä. Anna luokitukseksi 0–4+ näiden solujen sytoplasmaan saostuneen värin määrän ja voimakkuuden perusteella. Katso pisteytysominaisuudet taulukosta 1. Pisteinä pidetään 100 solun luokitusten summaa.

Taulukko 1. Pisteytysominaisuudet*

Saostunut atsoväri sytoplasmassa				Sytoplasman tausta
Solun luokitus	Määrä** (%)	Granulan koko	Värjäyksen voimakkuus	
0+	Ei yhtään	-	Ei yhtään	Ei yhtään
1+	50	Pieni	Heikko tai kohtalainen	Väritön tai hyvin haalean vaaleanpunainen tai sininen
2+	50–80	Pieni	Kohtalainen tai voimakas	Väritön tai haalean vaaleanpunainen tai sininen
3+	80–100	Keskisuuri tai suuri	Voimakas	Väritön tai vaaleanpunainen tai sininen
4+	100	Keskisuuri tai suuri	Kirkas	Ei näkyvissä

* Taulukossa 1 esitetään mukaelma Kaplow'n havainnoista.^{2,3}

** Atsovärisaostuman peittäjä prosentuaalinen osuus sytoplasman tilavuudesta.

Leukosyyttien alkaisen fosfataasin toiminnan (LAPA) pistemäärä muodostetaan kertomalla laskettujen solujen määrä solulokituksen arvolla. Näiden lukujen avulla saadaan LAPA-pisteet seuraavissa esimerkeissä esitetyllä tavalla:

Solun luokitus	Laskettu pistemäärä	LAPA-pisteet
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Yhteensä	100	67

Sigma-Aldrich sai seuraavat pisteet 40 terveeltä henkilöltä kuvatulla menetelmällä.

Nopea puna-violetti-LB	Nopea sini-BB
LAPA-keskiarvo ±1SD (keskihajonta)	76 ±31 94 ±39
LAPA-alue	44–106 55–133

Normaalien pisteiden vaihteluväli on laaja, 20–180. Näitä 40 normaaliita henkilöltä saatiin seuraava pistealue:

Nopea puna-violetti-LB	Nopea sini-BB
20–146	25–180

Jos havaitut tulokset eroavat odotetuista tuloksista, ota yhteyttä Sigma-Aldrichin tekniseen palveluun.

Analyyttiset suorituskykyominaisuudet

Kaikilla kohderakenteilla suoritetuista testeistä saadut analyyttiset suorituskykytulokset vahvistavat 100-prosenttisen herkkyyden, spesifisyyden ja toistettavuuden.

Luette-lonro	Tuotteen kuvaus	Kohde	Määrittymisen sisäisen spesifisyys	Määrittymisen sisäinen herkkyys	Määrittymisen välinen spesifisyys	Määrittymisen välinen herkkyys
861	Alkalinen naftoli-AS-BI-liuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
862	Alkalinen FRV-liuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
863	Alkalinen FBB-liuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
914	Natriumnitriittiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
915	Sitraattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
GHS3	Hematoksyliiniliuos, Gillin nro 3	Tumat	3/3	3/3	3/3	3/3
N6264	Neutraali punaliuos, puskuroitu	Tumat	3/3	3/3	3/3	3/3

Varoitukset ja vaarat

Katso päivitetty riski-, vaara- ja turvallisuustiedot käyttöturvallisuustiedotteesta ja tuotemerkinnöistä.

86C:



H290 Voi syövyttää metalleja.

H302 Haitallista nieltynä.

H315 Ärsyttää ihoa.

H317 Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion.

H319 Ärsyttää voimakkaasti silmiä.

H335 Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä.

H411 Myrkyllistä vesieläöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.

P234 Säilytä alkuperäispakkauksessa.

P273 Vältettävä päästämistä ympäristöön.

P280 Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

P301 + P312 JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.

P302 + P352 JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä.

P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

86R:



H290 Voi syövyttää metalleja.

H302 Haitallista nieltynä.

H315 Ärsyttää ihoa.

H318 Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa.

H373 Saattaa vahingoittaa elimiä (munuaiset) pitkäaikaisessa tai toistuvassa altistumisessa nieltynä.

P234 Säilytä alkuperäispakkauksessa.

P280 Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

P301 + P312 JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.

P302 + P352 JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä.

P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

P314 Hakeudu lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.

Jos tämän laitteen käytön aikana tai sen seurauksena ilmenee vakava vaaratilanne, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

Symbolien selitykset

Symbolit standardin EN ISO 15223-1:2021 mukaisesti

	Valmistaja		Luettelonumero
	Katso käyttöohje		Eräkoodi
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Euroopan unionissa		Vaatimustenmukaisuusvakuutus Euroopan unionin määräysten mukaisesti (IVDR-asetus 2017/746)
	Viimeinen käyttöpäivä		In vitro -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite
	Lämpötilarajoitus		Huomio
	Valmistuspäivä		Maahantuoja
	Osoittaa valtuutetun edustajan Sveitsissä		

Lähteet

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Yhteystiedot

Voit tehdä tilauksen verkkosivuiltamme osoitteessa [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Tekniseen palveluumme voi ottaa yhteyttä teknisen palvelun sivulla osoitteessa [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Versiohistoria

Versio 3.0	2014
Versio 4.0	2016
Versio 5.0	2023
	Siirretty uuteen pohjaan, jossa on ajantasaiset brändimerkit. Maininta ammattikäytöstä lisätty käyttötarkoitukseen ja varotoimiin. Käyttötarkoitus tarkistettu IVDR-ohjeistusten mukaisesti. "Materiaalin käyttöturvallisuustiedote" päivitetty muotoon "käyttöturvallisuustiedote". Yhteystiedot päivitetty. Poistettu ohje CLSI-ohjeistuksen noudattamisesta näytteenotossa. Symboliosiota poistettu "EN 980" ja tilalle vaihdettu "EN ISO 15223-1:2021". Lisätty haittatapahtumien yhteydessä käytettävät yhteystiedot. Lisätty versiohistoriataulukko. Lisätty kohta Varoitukset ja vaarat. Lisätty CH-REP-tiedot.
Versio 6.0	2024
	Korjattu sisäinen asiakirjanumero.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

M-alkukirjain ja Sigma-Aldrich ovat Merck KGaA -yhtiön, Darmstadt, Saksa, tai sen tytäryhtiöiden tavaramerkkejä. Kaikki muut tavaramerkit ovat haltijoidensa omaisuutta. Yksityiskohtaiset tavaramerkkitiedot ovat saatavilla julkisista lähteistä.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Gebruiksaanwijzing

Leukocyten alkalische fosfatase-kit

Procedurenr. 86



Beoogd gebruik

Alkalische-fosfatasekits van Sigma-Aldrich zijn bedoeld als een algemene histologische kleurstof voor laboratoriumgebruik. Alkalische-fosfatase-reagentia zijn uitsluitend bedoeld voor professioneel 'in-vitrodiagnostisch gebruik'. Deze handmatige, kwalitatieve histochemische procedure toont de alkalische-fosfatase-activiteit aan in leukocyten van humaan bloed of beenmergfilms. Histologische visualisatie van leukocytegeassocieerde alkalische fosfatase is een unieke techniek die momenteel veel gebruikt wordt in de geneeskunde.

In hematopoëtisch weefsel lijkt alkalische fosfatase beperkt tot neutrofielen met een band en gesegmenteerde neutrofielen.^{1,2} Het aantonen ervan door gelijktijdige vastlegging met gesubstitueerde naftolen en diazoniumzouten is misschien wel het vroegste voorbeeld van een cytochemische enzymtest met klinische betekenis.³

De meeste procedures, waaronder die van Sigma-Aldrich, maken gebruik van stabiele diazoniumzouten. Deze worden gevormd door een arylamine te laten reageren met natriumnitriet in een zuur medium.⁴ Het resulterende diazoniumchloride (meestal instabiel) kan vervolgens worden behandeld met verbindingen zoals zinkchloride, zinksulfaat of naftaleen-1,6-disulfonaat, waarbij stabiele zouten worden gevormd. Deze stabilisatoren kunnen een duidelijke remming uitoefenen op sommige enzymatische systemen, terwijl de diazoniumchloriden minder remmend werken.⁴ Om deze reden levert Sigma-Aldrich nu een stabiele oplossing van Fast red violet LB base, Fast blue BB base en natriumnitriet voor alkalische-fosfatasecytochemie. Om deze methoden verder te vereenvoudigen is ook een stabiele oplossing van naftol AS-BI-fosfaat opgenomen.

Om de test uit te voeren, worden gefixeerde bloedfilms bij kamertemperatuur (18-26 °C) geïncubeerd in een oplossing met naftol AS-BI-fosfaat en vers bereid Fast red violet LB-zout of Fast blue BB-zout gebufferd tot pH 9,5 met 2-amino-2-methyl-1,3-propaandiol (AMPD). Locaties van activiteit zijn rood of blauw, afhankelijk van de keuze van het diazoniumzout. De procedure met Fast red violet LB is vergelijkbaar met een voorgestelde NCCLS-referentiemethode.⁵

Reagentia

Naftol AS-BI alkalische oplossing (cat.nr. 861-10ML)

Naftol-AS-BI-fosfaat, 4 mg/ml, in AMPD-buffer, 2 mol/l, pH 9,5. Waarschuwing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. Damp niet inademen.

FRV alkalische oplossing (cat.nr. 862-10ML)

Fast red violet LB base, 5 mg/ml, in zoutzuur, 0,4 mol/l, met stabilisator. Waarschuwing. Schadelijk bij inslikken.

FBB alkalische oplossing (cat.nr. 863-10ML)

Fast blue BB base, 5 mg/ml, C.I. 37175, in zoutzuur, 0,4 mol/l, met stabilisator

Natriumnitrietoplossing (cat.nr. 914-10ML)

Natriumnitriet, 0,1 mol/l

Citraatoplossing (cat.nr. 915-50ML)

Citroenzuur, 18 mmol/l, natriumcitraat, 9 mmol/l, natriumchloride, 12 mmol/l met oppervlakteactieve stof, gebufferd tot pH 3,6

Hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3 (cat.nr. GHS3-50ML)

Hematoxyline, gecertificeerd, 6,0 g/l, C.I. 75290, natriumjodaat, 0,6 g/l en aluminiumsulfaat, 52,8 g/l, met stabilisatoren. Gevaar. Schadelijk bij inslikken. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/gezichtsbescherming.

Neutraalrood-oplossing, gebufferd (cat.nr. N6264-50ML)

Neutraalrood, gecertificeerd, 0,5% w/v, C.I. 50040, in acetaatbuffer, pH 5,2. Conserveermiddel toegevoegd.

Vereiste, maar niet meegeleverde speciale materialen

- Aceton, ACS-reagens
- Formaldehyde, 37% ACS

Opslag en stabiliteit

Bewaar naftol AS-BI alkalische oplossing, FRV alkalische oplossing, FBB alkalische oplossing en natriumnitrietoplossing in de koelkast (2-8 °C). Reagentia zijn stabiel tot de vervaldatum. Bewaar citraat-oplossing in de koelkast (2-8 °C). De oplossing is geschikt voor gebruik in afwezigheid van microbiële groei.

Bewaar hematoxyline-oplossing en neutraalrood-oplossing bij kamertemperatuur (18-26 °C). Bescherm hematoxyline-oplossing tegen licht. Reagentia zijn stabiel tot de vervaldatum.

Verslechtering

Gooi hematoxyline-oplossing weg als de oplossing bruin wordt (overgeoxideerd door lucht) of paars (zuurgraadverlies).

Voorbereiding

Reagentia worden gebruiksklaar geleverd.

Citraat-aceton-formaldehydefixatief: Voeg aan 25 ml citraat-oplossing, cat.nr. 915-50ML, 65 ml aceton en 8 ml 37%-formaldehyde toe. Doe dit in een glazen fles en sluit goed af. Bewaar in de koelkast (2-8 °C). Vóór gebruik opwarmen tot 18-26 °C. Stabiel gedurende 4 weken, mits goed afgesloten bewaard in de koelkast.

Voorzorgsmaatregelen

Deze IVD's zijn bedoeld voor in-vitrodiagnostisch gebruik in een klinische laboratoriumomgeving. Deze IVD's zijn uitsluitend bestemd voor professioneel gebruik door gekwalificeerd personeel. IVD's van Sigma-Aldrich mogen bediend worden door laboratoriumpersoneel dat opgeleid is om om te gaan met humane monsters die infectieus kunnen zijn, microscopen en andere laboratoriumapparatuur te gebruiken en met voldoende kleurwaarneming en gezichtsscherpte om kleuren en andere objecten onder een microscoop te onderscheiden.

De normale voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van laboratoriumreagentia moeten worden opgevolgd. Voer afval af met inachtneming van alle plaatselijke, provinciale of nationale voorschriften.

Procedure

Monsterafname

Geen enkele bekende testmethode kan volledige zekerheid bieden dat bloedmonsters of weefsels geen infectie overdragen. Daarom moeten alle bloederivaten of weefselmonsters als mogelijk infectieus worden beschouwd.

Vers bloed of beenmergfilms of monsters die geanticoaguleerd zijn met heparine mogen gebruikt worden.⁵ EDTA moet VERMEDEN worden.⁵ Bloedsmeers moeten binnen 8 uur na bereiding gekleurd worden op enzymactiviteit. Als dit echter niet mogelijk is, kan het geleidelijke verlies van alkalische-fosfataseactiviteit worden vertraagd door fixatie en overnachting in de vriezer.⁵ Films moeten ten minste 1 uur vóór fixatie en 3 uur na fixatie worden gedroogd alvorens in te vriezen.

Opmerkingen

Voer de procedure uit met positieve controles. Deze kunnen verkregen worden van patiënten met pyogene leukocytose, of vrouwen in het derde trimester van de zwangerschap of tijdens de eerste dagen na de bevalling. Leukocyten alkalische-fosfatasescores van deze personen zijn meestal hoger dan 100. Een negatieve controle kan bereid worden van een normaal gefixeerd smeear door deze 1 minuut in kokend water te dompelen om het enzym te inactiveren. Controlefolies kunnen tot 1 jaar worden bewaard indien ze gefixeerd worden opgeslagen, verpakt in Parafilm® bij -70 °C. Deze folies moeten ten minste 1 uur vóór de fixatie en 3 uur na de fixatie drogen voordat ze kunnen worden ingevroren.

Het wordt sterk aanbevolen dat elk laboratorium zijn eigen verwachte bereik vaststelt, kenmerkend voor de lokale populatie.

De procedure is afhankelijk van de subjectieve beoordeling van de gekleurde cellen. Dit kan resulteren in een grote variatie in de verkregen scores. De temperatuur van het reactiemengsel moet tussen 18 en 26 °C worden gehouden. Lagere temperaturen leiden tot aanzienlijk lagere scores. Boven 30 °C neemt de activiteit duidelijk toe. Eosinofielen kleuren niet, maar kunnen herkend worden aan dubbellobbige kernen en grote refractiele granula.

Er is een schaarste aan gegevens over verbindingen die de leukocyten alkalische fosfatase-activiteit (LAPA) kunnen verstoren. Van bepaalde geneesmiddelen en andere stoffen is bekend dat ze de circulerende alkalische-fosfataseactiviteit beïnvloeden.⁶ Orale anticonceptiva, cortisol en stress kunnen leiden tot verhoogde scores van leukocyten alkalische fosfatase.³

Bij mensen is de activiteit van alkalische fosfatase beperkt tot rijpe en bandvormige granulocyten. Af en toe kan een zwakke kleuring in lymfocyten worden waargenomen. Beenmergosteoblasten en endotheelcellen kleuren sterk.

Procedure

OPMERKING: Deel voor gebruik met Columbia-potjes de reagensvolumes door 5.

1. Meet 45 ml gede-ioniseerd water af en stel de temperatuur in op 18-26 °C.
2. Bereid diazoniumzout-oplossing:
Voeg 1 ml natriumnitrietoplossing toe aan 1 ml FRV alkalische oplossing
OF
Voeg 1 ml natriumnitriet-oplossing toe aan 1 ml FBB alkalische oplossing. Meng door voorzichtig omkeren. Laat 2 minuten staan.
3. Voeg de in stap 2 bereide oplossing toe aan het gede-ioniseerde water uit stap 1.
4. Voeg 1 ml naftol AS-BI alkalische oplossing toe aan de verdunde diazoniumzout-oplossing (stap 3). Meng goed en giet in een Coplin-pot.
5. Breng het citraat-aceton-formaldehyde-fixatief op kamertemperatuur (18-26 °C). Fixeer de objectglasjes door ze 30 seconden onder te dompelen in fixeeroplossing. Spoel voorzichtig 45 seconden in gede-ioniseerd water. Laat de objectglasjes niet drogen.
6. Voeg de objectglasjes toe aan het alkalische kleurstofmengsel (stap 4) en incubeer 15 minuten bij 18-26 °C. Bescherm ondergedompelde objectglasjes tegen direct licht. Gooi het alkalische kleurstofmengsel weg na gebruik.
7. Haal na 15 minuten incubatie de objectglasjes uit het Coplin-potje en spoel 2 minuten in gede-ioniseerd water. Laat de objectglasjes niet drogen.
8. Pas gedurende 2 minuten een tegenkleuring toe. Als FRV alkalische oplossing wordt gebruikt, pas dan een tegenkleuring toe met hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3. Als FBB alkalische oplossing wordt gebruikt, gebruik dan als tegenkleuring neutraalrood-oplossing, gebufferd.
9. Spoel de glasjes grondig af met kraanwater en laat ze aan de lucht drogen.
10. Evalueer microscopisch. Als coverslippen nodig is, gebruik dan alleen een waterig inbedmiddel.

Prestatiekenmerken

Scoremethode

Scan de film (900X) en selecteer een dun gebied waar erythrocyten elkaar nauwelijks raken. Locaties met fosfatase-activiteit verschijnen als blauwe of rode granula, afhankelijk van de gebruikte kleurstof. Selecteer 100 opeenvolgende gesegmenteerde en bandvormige neutrofiële granulocyten. Geef een score 0 tot 4+ op basis van de hoeveelheid en intensiteit van de neergeslagen kleurstof in het cytoplasma van deze cellen. Raadpleeg Tabel 1 voor de kenmerken van de scores. Het totaal van de scores van 100 cellen wordt beschouwd als de score.

Tabel 1. Kenmerken van scores*

Neergeslagen azokleurstof in cytoplasma				
Celscore	Hoeveelheid** (%)	Grootte granule	Kleuringsintensiteit	Achtergrond van cytoplasma
0+	Geen	-	Geen	Geen
1+	50	Klein	Vaag tot matig	Kleurloos tot zeer lichtroze of lichtblauw
2+	50-80	Klein	Matig tot sterk	Kleurloos tot lichtroze of lichtblauw
3+	80-100	Middelgroot tot groot	Sterk	Kleurloos tot roze of blauw
4+	100	Middelgroot tot groot	Schitterend	Niet zichtbaar

* Tabel 1 vertegenwoordigt een aanpassing van waarnemingen van Kaplow.^{2,3}

** Percentage van het volume cytoplasma ingenomen door neergeslagen azokleurstof.

Om de leukocyten alkalische fosfatase-activiteit (LAPA)-score te verkrijgen, wordt het aantal getelde cellen vermenigvuldigd met de waarde voor celscore. Deze cijfers worden opgeteld om de LAPA-score te verkrijgen, zoals weergegeven in de volgende voorbeelden:

Celscore	Getelde score	LAPA-score
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totaal	100	67

De volgende scores van 40 gezonde personen werden verkregen bij Sigma-Aldrich volgens de beschreven procedure.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
LAPA-gemiddelde ± 1SD	76±31	94±39
LAPA-bereik	44-106	55-133

Het bereik van normale scores is groot, variërend van 20 tot 180. Het volgende bereik scores werd verkregen bij deze 40 normale personen:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20-146	25-180

Als de waargenomen resultaten afwijken van de verwachte resultaten, neem dan contact op met de technische dienst van Sigma-Aldrich voor assistentie.

Analytische prestatiekenmerken

De resultaten van de analytische prestaties voor de gegeven tests, uitgevoerd op alle doelstructuren, bevestigen 100% gevoeligheid, specificiteit en herhaalbaarheid.

Cat. nr.	Productbeschrijving	Doel	Intra-assay specificiteit	Intra-assay gevoeligheid	Inter-assay specificiteit	Inter-assay gevoeligheid
861	Naftol AS-BI alkalische oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
862	FRV alkalische oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
863	FBB alkalische oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
914	Natriumnitrietoplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
915	Citraatoplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
GHS3	Hematoxyline-oplossing, Gill nr. 3	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
N6264	Neutraalrood-oplossing, gebufferd	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3

Waarschuwingen en gevaren

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad en de etikettering van het product voor bijgewerkte informatie over risico's, gevaren of veiligheid.

86C:



- H290 Kan bijtend zijn voor metalen.
- H302 Schadelijk bij inslikken.
- H315 Veroorzaakt huidirritatie.
- H317 Kan een allergische huidreactie veroorzaken.
- H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
- H335 Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
- H411 Giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.
- P234 Uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren.
- P273 Voorkom lozing in het milieu.
- P280 Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/ gezichtsbescherming.
- P301 + P312 NA INSLIKKEN: Bel een ANTIGIFCENTRUM/arts als u zich onwel voelt.
- P302 + P352 INDIEN OP DE HUID: Was met veel water.
- P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Verwijder contactlenzen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Ga verder met spoelen.

86R:



- H290 Kan bijtend zijn voor metalen.
- H302 Schadelijk bij inslikken.
- H315 Veroorzaakt huidirritatie.
- H318 Veroorzaakt ernstig oogletsel.

- H373 Kan bij inslikken schade aan organen (nieren) veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling.
- P234 Uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren.
- P280 Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/ gezichtsbescherming.
- P301 + P312 NA INSLIKKEN: Bel een ANTIGIFCENTRUM/arts als u zich onwel voelt.
- P302 + P352 INDIEN OP DE HUID: Was met veel water.
- P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Verwijder contactlenzen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Ga verder met spoelen.
- P314 Raadpleeg een arts als u zich onwel voelt.

Als zich tijdens het gebruik van dit apparaat of als gevolg van het gebruik ervan een ernstig incident heeft voorgedaan, meld dit dan aan de fabrikant en/of zijn gemachtigde vertegenwoordiger en aan uw nationale autoriteit.

Symbooldefinities

Symbolen zoals gedefinieerd in EN ISO 15223-1:2021

	Fabrikant		Catalogusnummer
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing		Batchcode
	Gemachtigd vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap/ Europese Unie		Conformiteitsverklaring van de Europese Unie (gedefinieerd in IVDR 2017/746)
	Uiterste gebruiksdatum		Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Temperatuurlimiet		Let op
	Fabricagedatum		Importeur
	Geeft de geautoriseerde vertegenwoordiger in Zwitserland aan		

Referenties

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248-250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Contactgegevens

Bezoek onze website op [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com) om een bestelling te plaatsen. Ga voor technische service naar de technische servicepagina op onze website [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Herzieningsgeschiedenis

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Overgezet naar nieuwe sjabloon met huidige huisstijl. Gespecificeerd voor professioneel gebruik in bedoeld gebruik en voorzorgsmaatregelen. Herziening beoogd gebruik om aan te sluiten bij IVDR-richtlijnen. Veiligheidsinformatieblad bijgewerkt tot veiligheidsinformatieblad. Contactgegevens bijgewerkt. Instructie om CLSI te volgen voor monsterafname verwijderd. EN 980 verwijderd en gewijzigd in EN ISO 15223-1:2021 voor symbolen. Contactinformatie over melding ongewenste voorvallen toegevoegd. Een tabel met de herzieningsgeschiedenis toegevoegd. Waarschuwingen en gevaren toegevoegd. CH-REP-informatie toegevoegd.	
Rev. 6.0	2024
Intern documentnummer gecorrigeerd.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

De Initial M en Sigma-Aldrich zijn handelsmerken van Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland of gelieerde ondernemingen. Alle andere handelsmerken zijn eigendom van hun respectieve eigenaars. Gedetailleerde informatie over handelsmerken is beschikbaar via openbaar toegankelijke bronnen.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Navodila za uporabo

Komplet za alkalno fosfatazo levkocitov

Postopek št. 86



Predvidena uporaba

Kompleti za alkalno fosfatazo Sigma-Aldrich so namenjeni splošni laboratorijski uporabi za histološko barvanje. Reagenti alkalne fosfataze so namenjeni samo za profesionalno »diagnostično uporabo in vitro«. Ta ročni, kvalitativni, histokemični postopek dokazuje aktivnost alkalne fosfataze v levkocitih iz človeške krvi ali kostnega mozga. Histološka vizualizacija z levkociti povezane alkalne fosfataze je edinstvena tehnika, ki se trenutno pogosto uporablja v medicini.

V krvotvornem tkivu je alkalna fosfataza omejena na trakove in segmentirane nevtrofilce.^{1,2} Njen dokaz s hkratnim zajemom s substituiranimi naftoli in diazonijevimi solmi je morda najzgodnejši primer citokemičnega encimskega testa s kliničnim pomenom.³

Pri večini postopkov, vključno s tistimi, ki jih ponuja Sigma-Aldrich, so uporabljene stabilne diazonijeve soli. Te nastanejo z reakcijo arilamina z natrijevim nitritom v kislem mediju.⁴ Nastali diazonijev klorid (običajno nestabilen) se lahko nato obdela s spojinami, kot so cinkov klorid, cinkov sulfat ali naftalen-1,6-disulfonat, pri čemer nastanejo stabilne soli. Ti stabilizatorji lahko izrazito zavirajo nekatere encimske sisteme, medtem ko diazonijevi kloridi zavirajo manj.⁴ Zato podjetje Sigma-Aldrich zdaj ponuja stabilne osnovne raztopine Fast Red Violet LB, Fast Blue BB in natrijevega nitrita za citokemijo alkalne fosfataze. Za dodatno poenostavitev teh metod je vključena stabilna raztopina naftol AS-BI fosfata.

Za izvedbo testa se fiksirani krvni filmi inkubirajo pri sobni temperaturi (18–26 °C) v raztopini, ki vsebuje naftol AS-BI fosfat in sveže pripravljeno sol Fast Red Violet LB ali sol Fast Blue BB, pufrirano pri pH 9,5 z 2-amino-2-metil-1,3-propandiolom (AMPD). Lokacije aktivnosti so rdeče ali modre, odvisno od izbire diazonijeve soli. Postopek, ki vključuje Fast Red Violet LB, je podoben predlagani referenčni metodi NCCLS.⁵

Reagenti

Naftol AS-BI alkalna raztopina (kat. št. 861-10ML)

Naftol AS-BI fosfat, 4 mg/ml, v pufru AMPD, 2 mol/l, pH 9,5. Opozorilo. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Lahko povzroči draženje dihal. Izogibajte se vdihavanju hlapov.

FRV-alkalna raztopina (kat. št. 862-10ML)

Osnovna raztopina Fast red violet LB, 5 mg/ml, v klorovodikovi kislini, 0,4 mol/l, s stabilizatorjem. Opozorilo. Zdravju škodljivo pri zaužitju.

FBB-alkalna raztopina (kat. št. 863-10ML)

Osnovna raztopina Fast blue BB, 5 mg/ml, C.I. 37175, v klorovodikovi kislini, 0,4 mol/l, s stabilizatorjem

Raztopina natrijevega nitrita (kat. št. 914-10ML)

Natrijev nitrit, 0,1 mol/l

Raztopina citrata (kat. št. 915-50ML)

Citronska kislina, 18 mmol/l, natrijev citrat, 9 mmol/l, natrijev klorid, 12 mmol/l s tenzidom, pufrirano pri pH 3,6

Hematoksilinska raztopina, Gill št. 3 (kat. št. GHS3-50ML)

Hematoksilin, certificiran, 6,0 g/l, C.I. 75290, natrijev jodat, 0,6 g/l, in aluminijev sulfat, 52,8 g/l, s stabilizatorji. Nevarno. Zdravju škodljivo pri zaužitju. Povzroča hude poškodbe oči. Uporabljajte zaščitne rokavice/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Neutrarno rdeča raztopina, pufrirana (kat. št. N6264-50ML)

Neutrarno rdeča, certificirano, 0,5 % m/v, C.I. 50040, v acetatnem pufru, pH 5,2. Dodan je konzervans.

Posebni materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi

- Aceton, reagent ACS
- Formaldehid, 37 %, ACS

Shranjevanje in stabilnost

Alkalno raztopino naftola AS-BI, FRV-alkalno raztopino, FBB-alkalno raztopino in raztopino natrijevega nitrita hranite v hladilniku (2–8 °C). Reagenti so stabilni do izteka roka uporabnosti. Citratno raztopino hranite v hladilniku (2–8 °C). Raztopina je primerna za uporabo ob odsotnosti mikrobnih rasti.

Raztopino hematoksilina in nevtrarno rdečo raztopino hranite pri sobni temperaturi (18–26 °C). Raztopino hematoksilina zaščitite pred svetlobo. Reagenti so stabilni do izteka roka uporabnosti.

Poslabšanje kakovosti

Raztopino hematoksilina zavrzite, če postane rjava (prevelika oksidacija zaradi zraka) ali vijoličasta (izguba kislosti).

Priprava

Reagenti so pripravljeni za uporabo.

Citratno-acetonsko-formaldehidni fiksativ: V 25 ml raztopine citrata, kat. št. 915-50ML, dodajte 65 ml acetona in 8 ml 37-odstotnega formaldehida. Prelijte v steklenico in jo trdno zaprite. Hranite v hladilniku (2–8 °C). Pred uporabo segrejte na 18–26 °C. Obstoynost do 4 tedne, če je hranjeno trdno zaprto v hladilniku.

Previdnostni ukrepi

Ti izdelki IVD so namenjeni za diagnostično uporabo in vitro v kliničnem laboratoriju. Ti izdelki IVD so namenjeni le strokovni uporabi s strani usposobljenega osebja. Z napravami Sigma-Aldrich IVD lahko upravlja laboratorijsko osebje, ki je usposobljeno za ravnanje s človeškimi vzorci, ki so lahko kužni, za uporabo mikroskopov in druge laboratorijske opreme ter imajo sposobnost zaznavanja barv in ostrino vida za razlikovanje barv in drugih predmetov pod mikroskopom.

Upoštevati je treba običajne previdnostne ukrepe pri ravnanju z laboratorijskimi reagenti. Odpadke odstranite v skladu z vsemi lokalnimi, državnimi, pokrajinskimi ali nacionalnimi predpisi.

Postopek

Zbiranje vzorcev

Nobena znana testna metoda ne more dati popolnega zagotovila, da vzorci krvi ali tkiva ne bodo prenesli okužbe. Zato je treba vse krvne derivate ali tkivne vzorce obravnavati kot potencialno kužne.

Uporabijo se lahko filmi sveže krvi ali kostnega mozga ali vzorci, antikoagulirani s heparinom.⁵ Izogibajte se EDTA.⁵ Krvne razmaze je treba v 8 urah po pripravi obarvati na encimsko aktivnost. Če to ni mogoče, lahko postopno izgubo aktivnosti alkalne fosfataze odložimo s fiksacijo in shranjevanjem čez noč v zamrzovalniku.⁵ Filme je treba posušiti vsaj 1 uro pred fiksacijo in 3 ure po fiksaciji pred zamrzovanjem.

Opombe

Izvedite postopek s pozitivnimi kontrolami. Te se lahko pridobi od bolnikov s piogeno levkocitozo ali žensk v tretjem trimesečju nosečnosti ali prvih nekaj dni po porodu. Rezultati levkocitne alkalne fosfataze pri teh osebah običajno presegajo 100. Negativno kontrolo lahko pripravimo iz normalnega fiksiranega razmaza tako, da ga za 1 minuto potopimo v vrelo vodo, da se encim inaktivira. Kontrolne filme lahko hranite do 1 leta, če jih hranite fiksirane, zavite v Parafilm® pri –70 °C. Te filme je treba sušiti vsaj 1 uro pred fiksacijo in 3 ure po fiksaciji, preden jih zamrznete.

Priporočljivo je, da vsak laboratorij določi svoje pričakovano območje, značilno za lokalno populacijo.

Postopek je odvisen od subjektivne ocene obarvanih celic. To lahko povzroči velike razlike v pridobljenih ocenah. Temperatura reakcijske mešanice mora biti med 18 in 26 °C. Pri nižjih temperaturah bodo rezultati bistveno nižji. Pri temperaturi nad 30 °C se aktivnost izrazito poveča. Eozinofili se ne obarvajo, prepoznamo pa jih po dvokrakih jedrih in velikih lomljivih granulah.

Podatkov o spojinah, ki lahko vplivajo na aktivnost levkocitne alkalne fosfataze (LAPA), je malo. Znano je, da nekatera zdravila in druge snovi vplivajo na aktivnost alkalne fosfataze v krvi.⁶ Peroralni kontraceptivi, kortizol in stres lahko povzročijo povišane vrednosti levkocitne alkalne fosfataze.³

Pri ljudeh je aktivnost alkalne fosfataze omejena na zrele in pasovno oblikovane granulocite. Občasno lahko v limfocitih opazimo šibko obarvanje. Osteoblasti kostnega mozga in endotelijske celice se močno obarvajo.

Postopek

OPOMBA: Za uporabo s kozarci Columbia delite volumne reagentov s 5.

1. Odmerite 45 ml deionizirane vode in nastavite temperaturo na 18–26 °C.
2. Pripravite raztopino diazonijeve soli:
Dodajte 1 ml raztopine natrijevega nitrita v 1 ml FRV-alkalne raztopine ALI
dodajte 1 ml raztopine natrijevega nitrita v 1 ml FBB-alkalne raztopine. Nežno premešajte z obračanjem. Pustite stati 2 minuti.
3. Raztopino, pripravljeno v koraku 2, dodajte deionizirani vodi iz koraka 1.
4. Razredčeni raztopini diazonijeve soli (korak 3) dodajte 1 ml alkalne raztopine naftola AS-BI. Temeljito premešajte in prelijte v kozarec Coplin.
5. Citratno-acetonsko-formaldehidno fiksirno sredstvo segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C). Stekelca fiksirajte tako, da jih za 30 sekund potopite v fiksirno raztopino. V deionizirani vodi nežno izpirajte 45 sekund. Ne dovolite, da se stekelca posušijo.
6. Stekelca dodajte mešanici alkalnega barvila (iz koraka 4) in jih 15 minut inkubirajte pri temperaturi 18–26 °C. Potopljena stekelca zaščitite pred neposredno svetlobo. Po uporabi zavrzite mešanico alkalnega barvila.
7. Po 15 minutah inkubacije odstranite preparate iz kozarca Coplin in jih 2 minuti izpirajte v deionizirani vodi. Ne dovolite, da se stekelca posušijo.
8. Barvajte s protibarvilom 2 minuti. Če uporabljate FRV-alkalno raztopino, barvajte s protibarvilom, raztopino hematoksilina, Gill št. 3. Če uporabljate FBB-alkalno raztopino, barvajte s protibarvilom, nevtrarno rdečo raztopino, pufrirano.
9. Stekelca temeljito sperite v sveži vodi in posušite na zraku.
10. Ocenite mikroskopsko. Če je potrebno prekrivanje, uporabite samo vodni medij za pritrdjevanje.

Lastnosti delovanja

Način točkovanja

Preglejte film (900X) in izberite tanko področje, kjer se eritrociti komajda dotikajo. Mesta fosfatne aktivnosti bodo videti kot modra ali rdeča zrnca, odvisno od uporabljenega barvila. Izberite 100 zaporednih segmentiranih in trakastih nevtrofilnih granulocitov. Ocenite od 0 do 4+ na podlagi količine in intenzivnosti oborjenega barvila v citoplazmi teh celic. Značilnosti točkovanja so navedene v tabeli 1. Vsota ocen 100 celic se šteje kot ocena.

Tabela 1. Značilnosti točkovanja*

Oborjeno azobarvilo v citoplazmi				
Ocena celic	Količina** (%)	Velikost granul	Intenzivnost obarvanja	Ozadje citoplazme
0+	Brez	-	Brez	Brez
1+	50	Malo	Šibko do zmerno	Brezbarvno do zelo bledo rožnato ali modro
2+	50–80	Malo	Zmerno do močno	Brezbarvno do bledo rožnato ali modro
3+	80–100	Srednje do veliko	Močno	Brezbarvno do rožnato ali modro
4+	100	Srednje do veliko	Briljantno	Ni vidno

* Tabela 1 predstavlja modifikacijo opažanj Kaplowa.^{2,3}

** Odstotek prostornine citoplazme, ki jo zaseda oborina azobarvila.

Da bi dobili oceno aktivnosti alkalne fosfataze levkocitov (LAPA), število prešteti celic pomnožimo z vrednostjo za oceno celic. Te vrednosti se seštejejo, da se dobi ocena LAPA, kot je prikazano v naslednjih primerih:

Ocena celic	Preštet rezultat	Rezultat LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Skupaj	100	67

Naslednji rezultati 40 zdravih posameznikov so bili pridobljeni v podjetju Sigma-Aldrich po opisanem postopku.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Srednja vrednost LAPA ± 1SD	76 ± 31	94 ± 39
Razpon LAPA	44–106	55–133

Razpon normalnih rezultatov je širok in se giblje od 20 do 180. Pri teh 40 normalnih posameznikih je bil dosežen naslednji razpon rezultatov:

Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
20–146	25–180

Če opaženi rezultati odstopajo od pričakovanih, se za pomoč obrnite na oddelek za tehnično pomoč podjetja Sigma-Aldrich.

Značilnosti analitične učinkovitosti

Rezultati analitične učinkovitosti za dane teste, opravljene na vseh ciljnih strukturah, potrjujejo 100-odstotno občutljivost, specifičnost in ponovljivost.

Kat. št.	Opis izdelka	Cilj	Specifičnost znotraj testa	Občutljivost znotraj testa	Specifičnost med testi	Občutljivost med testi
861	Alkalna raztopina naftola AS-BI	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
862	FRV-alkalna raztopina	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
863	FBB-alkalna raztopina	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
914	Raztopina natrijevega nitrita	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
915	Raztopina citrata	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
GHS3	Raztopina hematoksilina, Gill št. 3	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
N6264	Nevtralna rdeča raztopina, pufrirana	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3

Opozorila in nevarnosti

Vse posodobljene informacije o tveganju, nevarnosti ali varnosti najdete na varnostnem listu in oznaki izdelka.

86C:



H290 Lahko je korozivno za kovine.

H302 Škodljivo pri zaužitju.

H315 Povzroča draženje kože.

H317 Lahko povzroči alergijsko kožno reakcijo.

H319 Povzroča hudo draženje oči.

H335 Lahko povzroči draženje dihalnih poti.

H411 Strupeno za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki.

P234 Hranite samo v originalni embalaži.

P273 Preprečiti sproščanje v okolje.

P280 Nosite zaščitne rokavice/zaščitno za oči/zaščitno za obraz.

P301 + P312 V PRIMERU ZAUŽITJA: Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/ zdravnika.

P302 + P352 PRI STIKU S KOŽO: Sperite z veliko vode.

P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

86R:



H290 Lahko je korozivno za kovine.

H302 Škodljivo pri zaužitju.

H315 Povzroča draženje kože.

H318 Povzroča resne poškodbe oči.

H373 Pri dolgotrajni ali ponavljajoči se izpostavljenosti lahko ob zaužitju povzroči poškodbe organov (ledvice).

P234 Hranite samo v originalni embalaži.

P280 Nosite zaščitne rokavice/zaščitno za oči/zaščitno za obraz.

P301 + P312 V PRIMERU ZAUŽITJA: Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/ zdravnika.

P302 + P352 PRI STIKU S KOŽO: Sperite z veliko vode.

P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

P314 Če se ne počutite dobro, poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

Če je med uporabo te naprave ali kot posledica njene uporabe prišlo do resnega incidenta, o tem obvestite proizvajalca in/ali njegovega pooblaščenega zastopnika ter ustrezen državni organ.

Definicije simbolov

Simboli, kot so opredeljeni v standardu EN ISO 15223-1:2021

	Proizvajalec		Kataloška številka
	Natančno preberite navodila za uporabo		Koda serije
	Pooblaščen zastopnik v Evropski skupnosti/Evropski uniji		Izjava Evropske unije o skladnosti (opredeljena v IVDR 2017/746)
	Rok uporabe		Medicinski diagnostični pripomoček in vitro
	Temperaturna omejitev		Pozor
	Datum izdelave		Uvoznik
	Označuje pooblaščenega zastopnika v Švici		

Reference

- Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
- Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Kontaktni podatki

Če želite oddati naročilo, obiščite naše spletno mesto SigmaAldrich.com. Če želite tehnično pomoč, obiščite stran tehničnega servisa na našem spletnem mestu SigmaAldrich.com/techservice.

Zgodovina revizij

Rev. 3.0	2014
Rev. 4.0	2016
Rev. 5.0	2023
Preneseno v novo predlogo s trenutno blagovno znamko. Navedeno za poklicno uporabo v okviru predvidene uporabe in predvidnostnih ukrepov. Revidiran je namen uporabe za uskladitev s smernicami IVDR. Posodobljen je varnostni list materiala v varnostni list. Posodobljeni so kontaktni podatki. Odstranjeno je navodilo, da je treba pri zbiranju vzorcev upoštevati standard CLSI. Odstranjen je standard EN 980 in za simbole spremenjen v standard EN ISO 15223-1:2021. Dodani so kontaktni podatki v primeru neženelenih dogodkov. Dodana je preglednica zgodovine revizij. Dodana so opozorila in nevarnosti. Dodana informacija o zastopniku v Švici.	
Rev. 6.0	2024
Popravljen je interneta številka dokumenta.	

	Sigma-Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany +1(314) 771-5765		MDSS GmbH Schiffgraben 41 30175 Hannover, Germany		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
	MDSS CH GmbH Laurenzenvorstadt 61 5000 Aarau Switzerland				

Velika črka M in Sigma-Aldrich sta blagovni znamki družbe Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija ali njenih pridruženih družb. Vse druge blagovne znamke so last njihovih lastnikov. Podrobne informacije o blagovnih znakih so na voljo v javno dostopnih virih.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.