

1.16300.0002

Microscopía

LEUCOGNOST®-ALPA

Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos

IVD Producto sanitario para diagnóstico in vitro



Kit de reactivos citoquímicos para diagnóstico de la leucemia

El presente kit de "LEUCOGNOST®-ALPA - Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos" es utilizado para el diagnóstico celular en la medicina humana, se emplea en el examen hematológico y citológico de muestras de origen humano. Se trata de un kit de tinción que, junto con otros materiales de diagnóstico in vitro pertenecientes a nuestra cartera, hace evaluables determinadas para el diagnóstico estructuras de destino (mediante fijación, tinción, dado el caso contratinción, montaje) en material de examen hematológico y clínico-citológico, como p.ej. frotis de sangre total y de médula ósea.

El presente kit de tinción está previsto para la reacción en la cubeta de 60 ml de Hellendahl y contiene todos los reactivos necesarios para detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALPA) en leucocitos.

Principio

Para la delimitación citoquímica de una leucemia mieloica crónica (CML) de otras enfermedades del tipo de formas mielo-proliferativas, especialmente frente a la mielofibrosis y la policitemia o, respectivamente, otros procesos inflamatorios o tumorosos, es adecuada la determinación de la actividad (índice) de la fosfatasa alcalina de leucocitaria. Además, el índice de la fosfatasa alcalina de leucocitaria representa un parámetro sencillo del transcurso en el caso de CML, que refleja diversas fases de actividad de la enfermedad hematológica.

La fosfatasa alcalina de leucocitaria cataliza la hidrólisis de ésteres fosfóricos en medio alcalino. El 1-naftol liberado a partir del fosfato de 1-naftilo se acopla con una sal de diazonio para dar un azocolorante pardo, que precipita en la célula de acuerdo con la localización y la actividad de la fosfatasa alcalina en la célula.

Material de las muestras

Como material de partida para todas las tinciones deberían utilizarse preparados procedentes de la citocentrífuga y frotis frescos y nativos de sangre o médula ósea. Por ejemplo, el uso de EDTA como anticoagulante debilita la reacción de enzima de forma importante, por esto no es recomendable la adición de sustancias inhibitorias de la coagulación.

Reactivos

Art. 1.16300.0002

LEUCOGNOST®-ALPA

Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos

Componentes del envase:

El kit de tinción contiene

Reactivo 1: LEUCOGNOST® ALPA Tris(hidroximetil)-aminometano

Reactivo 2: LEUCOGNOST® ALPA Fosfato de 1-naftilo sal sódico

Reactivo 3: LEUCOGNOST® ALPA Variamin® sal azul B

1 cuchara dosificadora

Necesario además:

Art. 108562	Aquatex® (medio de montaje acuoso) para microscopía	frasco gotero de 50 ml
Art. 109249	Hemalumbre en solución según Mayer para microscopía	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 112327	LEUCOGNOST® mezcla fijadora para citoquímica de enzimas	500 ml

Preparación de las muestras

La toma de muestra debe ser realizada por personal especializado.

Se necesitan frotis de sangre o médula ósea finos, secados al aire y guardados como máximo durante 3 días.

Los frotis han de ser secados al aire durante 30 minutos como mínimo, debiéndose fijar éstos antes de la reacción citoquímica propiamente dicha según las correspondientes prescripciones.

Fijación de los frotis sanguíneos o de médula ósea secados al aire en la mezcla fijadora LEUCOGNOST®	1 - 3 minutos
Enjuagar con agua corriente del grifo	10 segundos
Secar al aire	

Después de la fijación los frotis podrán ser almacenados hasta 3 días en el frigorífico.

Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con el estado de la tecnología. Todas las muestras deben estar rotuladas inequívocamente. Deben usarse instrumentos adecuados para la toma de muestras y en la preparación, y deben seguirse las instrucciones del fabricante para la aplicación / el empleo.

Preparación de reactivos

Solución de tinción

Utilizar solamente soluciones recién preparadas.

Reactivo 1 (tris(hidroximetil)-amino-metano)	4 cucharadas dosificadoras rasas (adjunta; aprox. 1,1 g)
Agua destilada	100 ml
Disolver el reactivo completamente = solución A	

Reactivo 2 (fosfato de 1-naftilo sal sódico)	contenido completo del frasco
Solución A	15 ml
Enjuagar el reactivo a la cubeta de tinción de Hellendahl con 15 ml de la solución A = solución B	

Reactivo 3 (Variamin® sel bleu B)	contenido completo del frasco
Solución A	45 ml
Enjuagar el reactivo a un matraz Erlenmeyer con 45 ml de la solución A agitar intensamente durante 2 minutos filtrar a través de un filtro de paso rápido a la cubeta de tinción pasando a la solución B mezclar bien = solución de tinción	

La solución de tinción preparada es utilizable durante 90 minutos como máximo. La coloración propia de la solución reactiva es pardo rojiza y se enturbia rápidamente.

La turbidez no influye en la calidad de la tinción.

Técnica

Tinción en la cubeta de 60 ml de Hellendahl

Los portaobjetos han de ser inmersos y movidos brevemente en las soluciones, la simple introducción proporcionará resultados de tinción insuficientes.

Los portaobjetos deberían ser escurridos bien por goteo después de los diferentes pasos de tinción, de esta manera se podrá evitar el innecesario arrastre de soluciones.

Para conseguir un óptimo resultado de tinción, deberían respetarse los períodos indicados.

Portaobjeto con frotis fijado	
Introducir en solución de tinción recién preparada	10 - 15 minutos
Introducir en agua destilada	
Secar al aire	
Contratinción con hemalumbre en solución según Mayer	5 minutos
Enjuagar con agua corriente del grifo	1 - 3 minutos
Secar al aire (p.ej. durante la noche o a 50 °C en el armario de secado)	
Si es necesario, montar con Aquatex® y cubreobjetos.	

Para el almacenamiento de preparados hematológicos durante varios meses se recomienda el montaje con un medio de montaje acuoso (p.ej. Aquatex®) y un cubreobjetos. Sin montaje, la tinción tendrá una estabilidad de unos 3 días; si se cubre con aceite de inmersión, la estabilidad será de sólo unas horas.

Para el análisis de preparados teñidos con un aumento microscópico >40x se recomienda el uso de aceite de inmersión.

Resultado

El producto de reacción pardo se encuentra solamente en las etapas de maduración final de la granulopoyesis. Son evaluados 100 segmentados neutrófilos; en caso de una neutropenia como máximo hasta un 10 % de granulocitos con núcleo en banda.

El recuento tiene lugar según el grado de intensidad de la tinción.

Se distinguen las siguientes cinco graduaciones de intensidad decolor.

- Grado de intensidad 0: sin reacción
- Grado de intensidad 1: de uno a pocos gránulos
- Grado de intensidad 2: muchos gránulos localizados
- Grado de intensidad 3: gránulos difusamente distribuidos
- Grado de intensidad 4: célula completamente ocupada de gránulos
- Grado de intensidad 5: número máximo de gránulos, frecuentemente no se puede ver el núcleo

Evaluación

Si se multiplican los números de porcentaje encontrados por las cifras de las clases de reacción que corresponden en cada caso y se suman los productos se obtiene el índice de ALPA (sin dimensiones).

Exemple d'évaluation:

Número de células (%)	x	Grado de intensidad	=	Producto
8	x	0	=	0
42	x	1	=	42
24	x	2	=	48
12	x	3	=	36
7	x	4	=	28
7	x	5	=	35
Suma = índice de ALPA				= 189

Valores normales: 10 a 100

Un índice disminuido es patognomónico para la fase de enfermedad activa de una leucemia crónica mieloica. Como máximo en las anemias hemolíticas, las anemias por deficiencia de hierro o algunas enfermedades víricas se pueden observar valores de índices comparablemente bajos. Los valores normales y aumentado tienen siempre una significación múltiple, de manera que carecen de importancia para un diagnóstico diferencial. También las leucemias crónicas mieloicas en remisión pueden mostrar valores normales o incluso aumentados de ALPA. En general, el índice será tanto más alto cuanto más pronunciados sean los procesos de disgregación necrobióticos (por ejemplo histólisis inflamables) que tengan lugar en el marco de procesos inflamables o tumorosos.

Notas técnicas

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico.

Eliminar el aceite de inmersión en exceso antes de archivar.

Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas.

Deberán emplearse terminologías vigentes.

Deberán elegirse y realizarse ensayos posteriores según métodos reconocidos.

Cada aplicación debería implicar controles adecuados para descartar resultados erróneos.

Almacenamiento

Guardar el kit de LEUCOGNOST®-ALPA - Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos de +2 °C a +8 °C.

Estabilidad

El kit de LEUCOGNOST®-ALPA - Identificación de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos puede usarse hasta la fecha de caducidad indicada.

Después de abrir el frasco por primera vez, el contenido almacenado entre +2 °C y +8 °C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada.

Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

La solución de tinción recién preparada es utilizable durante 90 minutos como máximo.

Capacidad

El kit de tinción es suficiente para 12 tinciones con hasta 16 preparados.

En las cubetas de 60 ml de Hellendahl con ampliación (corresponde a una preparación de tinción) pueden teñirse simultáneamente hasta 8 portaobjetos, y, colocados reverso frente a reverso, hasta 16 portaobjetos.

Notas sobre el empleo

Solamente para uso profesional.

Para evitar errores, la aplicación debería ser realizada por personal especializado. Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad.

Deben emplearse microscopios equipados de acuerdo con el estándar.

Protección contra infecciones

Debe observarse a toda costa una protección eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de laboratorio.

Indicaciones para la eliminación de residuos

El envase debe ser eliminado de acuerdo con las directivas válidas de eliminación de residuos.

Las soluciones usadas y las soluciones caducadas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos. Podrá pedirse información sobre los procedimientos de eliminación bajo el Quick Link "Hints for Disposal of Microscopy Products" en www.microscopy-products.com. Dentro de la UE tiene validez el REGLAMENTO (CE) N° 1272/2008 sobre la clasificación, el etiquetado y el envasado de sustancias y mezclas, por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) N° 1907/2006.

Reactivos auxiliares

Art. 104699	Aceite de inmersión para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 100 ml, 500 ml
-------------	--------------------------------------	---

Art. 108562	Aquatex® (medio de montaje acuoso) para microscopía	frasco gotero de 50 ml
Art. 109249	Hemalumbre en solución según Mayer para microscopía	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 112327	LEUCOGNOST® mezcla fijadora para citoquímica de enzimas	500 ml

Clasificación de sustancias peligrosas

Art. 1.16300.0002

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta y las indicaciones en la ficha de datos de seguridad.

La ficha de seguridad está disponible en el sitio web y a solicitud.

Componentes principales de los productos

Art. 1.16300.0002

Reactivo 1	
Tris(hidroximetil)-aminometano	130 mmol
Reactivo 2	
Fosfato de 1-naftilo sal sódico	120 µmol
Reactivo 3	
Variamin® sal azul B	68 mg

Otros productos de IVD

Art. 101424	Eosina-azul de metileno en solución según May-Grünwald modificada para microscopía	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109016	Neo-Mount® medio de montaje anhidro para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 500 ml
Art. 109204	Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa en solución para microscopía	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109843	Neo-Clear® (sustituto de xileno) para microscopía	5 l
Art. 115355	CYTOCOLOR® Tinción citológica estándar según Szczepanik para microscopía	6x 500 ml
Art. 116301	LEUCOGNOST® EST identificación de la reacción de α-acetato de naftilo-esterasa en leucocitos	12 units
Art. 116302	LEUCOGNOST® PAS detección de la reacción ácido peryódico Schiff en leucocitos	12 units
Art. 116303	LEUCOGNOST® POX Detección de la reacción de la peroxidasa en leucocitos	12 units
Art. 116304	LEUCOGNOST® AP detección de la reacción de la fosfatasa ácida en leucocitos	12 units
Art. 117198	LEUCOGNOST® NASDCL nuevo detección de naftol-AS-D-cloroacetato-esterasa en granulocitos	12 units

Literatura

- Löffler, H., Rastetter, J., Haferlach, T, Atlas der klinischen Hämatologie, 2004, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing Company
- Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A.) Bios, 2002



Consult instructions for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult accompanying documents



Use by YYYY-MM-DD



Temperature limitation

Status: 2017-09-19

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

