

## TILSIGTET ANVENDELSE

Sigma-Aldrichs alkalisk fosfatasesæt er beregnet til anvendelse ved histokemisk semikvantitativ påvisning af alkalisk fosfataseaktivitet i leukocytter. Alkalisk fosfatasese reagenser er til in vitro diagnostisk brug.

I hæmopoietisk væv synes alkalisk fosfatase at være begrænset til bånd- og segmentneutrofiler.<sup>1-2</sup> Påvisning deraf ved simultanabsorption vha. syntetiske naphtholer og diazoniumsalte er måske det tidligste eksempel på en cytochemisk enzymtest med klinisk signifikans.<sup>3</sup>

De fleste procedurer, inklusive Sigma-Aldrichs procedurer, anvender stabile diazoniumsalte. Disse salte dannes ved at lade et arylamin reagere med natriumnitrit i et syremedium.<sup>4</sup> Reaktionsproduktet diazoniumklorid (der som regel er ustabil) kan behandles med forbindelser, såsom zinkklorid, zinksulfat eller naftalen-1,6-disulfonat, så der dannes stabile salte. Disse stabilisatorer kan i udpræget grad hæmme visse enzymatiske systemer, hvorimod diazoniumklorid er mindre hæmmende.<sup>4</sup> Derfor fører Sigma-Aldrich nu stabile opløsninger af Fast Red Violet LB basis, Fast Blue BB basis og natriumnitrit til alkalisk fosfatasecytokemi. Til yderligere forenkling af disse metoder følger der en stabil opløsning af naphthol AS-BI fosfat med.

Testen udføres ved at inkubere fikserede blodfilm ved stuetemperatur (18–26 °C) i en opløsning, der indeholder naphthol AS-BI fosfat og frisklavet Fast Red Violet LB-salt eller Fast Blue BB-salt bufferet ved pH 9,5 med 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (AMPD). Aktivitetsstederne er enten røde eller blå, alt afhængigt af valg af diazoniumsalt. Proceduren, der inkorporerer Fast Red Violet LB, er omtrent som en foreslået NCCLS-referencemetode.<sup>5</sup>

## REAGENSER

### NAPHTHOL AS-BI ALKALIOPPLØSNING, katalognr. 86-1

Naphthol AS-BI fosfat, 4 mg/ml, i AMPD-buffer, 2 mol/l, pH 9,5.

### FRV-ALKALIOPPLØSNING, katalognr. 86-2

Fast Red Violet LB basis, 5 mg/ml, i saltsyre, 0,4 mol/l, med stabilisator.

### FBB-ALKALIOPPLØSNING, katalognr. 86-3

Fast Blue BB basis, 5 mg/ml, i saltsyre, 0,4 mol/l, med stabilisator.

### NATRIUMNITRITOPPLØSNING, katalognr. 91-4

Natriumnitrit, 0,1 mol/l.

### CITRATOPPLØSNING, katalognr. 91-5

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

### HEMATOXYLINOPPLØSNING, GILL NR. 3, katalognr. GHS-3

Hematoxylin, certificeret, 6,0 g/l, natriumjodat, 0,6 g/l, og aluminiumsulfat, 52,8 g/l, med stabilisatorer.

### NEUTRAL RØD OPLØSNING, BUFFERET, katalognr. N 6264

Neutral rød, certificeret, 0,5 % vægt/vol, i acetatbuffer, pH 5,2. Tilsat konserveringsmidler.

### OPBEVARING OG STABILITET:

Naphthol AS-BI alkaliopløsning, FRV-alkaliopløsning, FBB-alkaliopløsning og natriumnitritopløsning opbevares i køleskab (2–8 °C). Reagenserne er stabile indtil udløbsdatoen.

Citratopløsning opbevares i køleskab (2–8 °C). Opløsningen er velegnet til anvendelse ved fravær af mikrobiel vækst.

Hematoxylinopløsning og neutral rød opløsning opbevares ved stuetemperatur (18–26 °C). Hematoxylinopløsning skal beskyttes mod lys. Reagenserne er stabile indtil udløbsdatoen.

### FORRINGELSE:

Hematoxylinopløsning skal kasseres, hvis opløsningen bliver brun (for stærk oxidering med luft) eller lilla (syretab).

### KLARGØRING:

Reagenser leveres klar til brug.

**CITRAT-ACETONE-FORMALDEHYDFIKSATIV:** Tilsæt 65 ml acetone og 8 ml 37 % formaldehyd til 25 ml citratopløsning, katalognr. 91-5. Hæld opløsningen i en glasflaske, og sæt tæt lukkende låg på. Opbevares i køleskab (2–8 °C). Opvarmes til 18–26 °C inden brug. Stabil i op til 4 uger ved opbevaring tæt lukket i køleskab

### FORHOLDSREGLER:

De normale forholdsregler ved håndtering af laboratoriereagenser skal følges. Ved kassering af affald skal alle lokale og nationale bestemmelser overholdes. Der henvises til materialesikkerhedsdatabladet angående opdaterede oplysninger om risici, fare eller sikkerhed.

### Amerikanske risiko- og sikkerhedserklæringer

Naphthol AS-BI alkaliopløsning og neutral rød opløsning. Advarsel: Stoffet er endnu ikke fuldt ud testet.

FRV-alkaliopløsning er ÆTSENDE. Farlig ved indtagelse. Giftig ved indånding. Ættsningsfare. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Ved ulykkestilfælde eller ildebefindende bør der omgående søges lægehjælp (vis etikken hvis det er muligt). Målorganer: lever og nyrer.

FBB-alkaliopløsning er GIFTIG. Giftig ved indånding. Ættsningsfare. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Ved ulykkestilfælde

eller ildebefindende bør der omgående søges lægehjælp (vis etikken hvis det er muligt). Målorganer: lever og nyrer.

Gills 3 hematoxylinopløsning er SUNDHEDSSKADELIG. Farlig ved indtagelse. Irriterer øjnene, åndedrætsorganerne og huden. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, -handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Målorganer: lever og nyrer.

Acetone er BRÆNDBAR og LOKALIRRITERENDE. Irriterer øjnene. Gentagen kontakt kan medføre udtørring af eller revner i huden. Dampe kan forårsage sløvhed og svimmelhed. Emballagen skal opbevares på et godt ventileret sted. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Målorganer: lever og nyrer.

Formaldehydopløsning er GIFTIG. Giftig ved indånding, ved hudkontakt og ved indtagelse. Ættsningsfare. Begrænset dokumentation for kræftfremkaldende virkning. Kan give allergi ved hudkontakt. Kan forårsage arvelige genetiske skader. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Ved ulykkestilfælde eller ildebefindende bør der omgående søges lægehjælp (vis etikken hvis det er muligt). Må kun bruges på steder med god ventilation.

### Risiko- og sikkerhedserklæringer i EU

Naphthol AS-BI alkaliopløsning og neutral rød opløsning. Advarsel: Stoffet er endnu ikke fuldt ud testet.

FRV-alkaliopløsning og FBB-alkaliopløsning er SUNDHEDSSKADELIG. Farlig ved indtagelse. Bær passende beskyttelsesbeklædning.

Gills 3 hematoxylinopløsning er SUNDHEDSSKADELIG. Farlig ved indtagelse. Irriterer øjnene, åndedrætsorganerne og huden. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesbeklædning.

Acetone er MEGET BRANDFARLIG og LOKALIRRITERENDE. Meget brandfarlig. Irriterer øjnene. Gentagen kontakt kan medføre udtørring af eller revner i huden. Dampe kan forårsage sløvhed og svimmelhed. Emballagen skal opbevares på et godt ventileret sted. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges.

Formaldehydopløsning er GIFTIG. Giftig ved indånding, ved hudkontakt og ved indtagelse. Ættsningsfare. Begrænset dokumentation for kræftfremkaldende virkning. Kan give allergi ved hudkontakt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Ved ulykkestilfælde eller ildebefindende bør der omgående søges lægehjælp (vis etikken hvis det er muligt). Må kun bruges på steder med god ventilation.

## PROCEDURE

### PRØVEINDSAMLING:

Det anbefales, at prøveindsamling sker i henhold til NCCLS-dokumentet M29–A2. Der er ingen kendt testmetode, som kan give fuldstændig sikring af, at blodprøver eller væv ikke overfører infektion. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver behandles som potentielt infektiøse.

Der kan anvendes friskt blod, knoglemarvsfilm eller prøver, der er antikoaguleret med heparin.<sup>5</sup> EDTA SKAL UDGÅS.<sup>5</sup> Blodudstrygninger skal farves for enzymaktivitet i løbet af 8 timer efter klargøring. Hvis dette ikke er muligt, kan gradvis tab af alkalisk fosfataseaktivitet imidlertid forsinkes ved fiksering og opbevaring i fryser natten over.<sup>5</sup> Film skal tørre i mindst 1 time før fiksering og i 3 timer efter fiksering inden frysning.

### SÆRLIGE NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER:

ACETONE, ACS-reagens

FORMALDEHYD, 37 %, ACS

### BEMÆRKNINGER:

Proceduren skal udføres med positive kontroller. De kan fås fra patienter med pyogen leukocytose, fra kvinder i tredje svangerskabstrimester eller i de første dage efter en fødsel. Alkalisk fosfatase-scoring i leukocytter hos sådanne personer er normalt 100. En negativ kontrol kan klargøres af en normal fikseret udstrykning ved at anbringe den i kogende vand i 1 minut, så enzymet deaktiveres. Kontrolfilm kan opbevares i op til 1 år ved opbevaring fikseret, indpakket i Parafilm® ved -70 °C. Disse film skal tørre i mindst 1 time inden fiksering og i 3 timer efter fiksering inden frysning.

Det anbefales kraftigt, at de enkelte laboratorier etablerer deres eget forventede referenceområde, der er karakteristisk for lokalbefolkningen.

Proceduren afhænger af subjektiv bedømmelse af farvede celler. Det kan føre til stor variation i de bedømmelser, der opnås. Temperaturen på reaktionsblandingen skal holdes på 18–26 °C. Lavere temperatur resulterer i meget lavere scorer. Der sker en markant øgning i aktivitet ved temperatur over 30 °C. Eosinofiler farves ikke, men kan kendes på kerner med to lapper og store refraktile granula.

Der eksisterer meget få data om forbindelser, der kan påvirke alkalisk fosfataseaktivitet i leukocytter (LAPA). Visse medikamenter og andre stoffer vides at indvirke på cirkulerende alkalisk fosfataseaktivitet.<sup>6</sup> Orale antikonceptionsmidler, cortisol og stress kan medføre forhøjede alkaliske fosfatase-scoringer i leukocytter.<sup>3</sup>

Hos mennesker er alkalisk fosfataseaktivitet begrænset til modne og båndformede granulocytter. Der kan lejlighedsvis observeres svag farvning i lymfocytter. Knoglemarvsosteoblaster og endotelceller farves kraftigt. Markant øgning af alkalisk fosfatase i leukocytter i perifert blod er blevet observeret i multipel myelom, Hodgkins sygdom, polycytaemia vera og infektiøs leukocytose. Lav eller ingen aktivitet ses i kronisk myeloid leukæmi, arvelig hypofosfatasi og paroxysmal natlig hæmoglobinuri.

De data, som opnås via denne procedure, tjener kun som hjælp til diagnosticering og skal gennemses i forbindelse med andre kliniske diagnostiske tests eller oplysninger.

## PROCEDURE:

BEMÆRK: Hvis der anvendes Columbia-skåle, skal reagensmængden deles med 5.

- Mål 45 ml deioniseret vand op, og juster temperaturen til 18–26 °C.
- Klargør en diazoniumsaltopløsning:  
Tilsæt 1 ml natriumnitritopløsning til 1 ml FRV-alkaliopløsning  
ELLER  
Tilsæt 1 ml natriumnitritopløsning til 1 ml FBB-alkaliopløsning  
Bland opløsningen forsigtigt ved at vende den. Lad den stå i 2 minutter.
- Tilsæt opløsningen, der blev klargjort i trin 2, til det deioniserede vand fra trin 1.
- Tilsæt 1 ml naphthol AS-BI alkaliopløsning til den fortyndede diazoniumsaltopløsning (trin 3). Bland opløsningen godt, og hæld den i en Coplin-skål.
- Bring citrat-acetone-formaldehydfikseringsopløsning på stuetemperatur (18–26 °C). Fikser objektglassene ved at anbringe dem i fikseringsopløsning i 30 sekunder. Skyl dem forsigtigt i deioniseret vand i 45 sekunder. Objektglassene må ikke tørre.
- Anbring objektglassene i den alkaliske farvestofblanding (trin 4), og inkuber ved 18–26 °C i 15 minutter. Under inkubering skal objektglassene beskyttes mod direkte lys. Den alkaliske farvestofblanding kasseres efter brug.
- Efter 15 minutters inkubation tages objektglassene op af Coplin-skålen og skylles i 2 minutter i deioniseret vand. Objektglassene må ikke tørre.
- Kontrastfarv i 2 minutter. Hvis der anvendes FRV-alkaliopløsning, kontrastfarves der med hematoxylinopløsning, Gill nr. 3. Hvis der anvendes FBB-alkaliopløsning, kontrastfarves der med neutral rød opløsning, bufferet.
- Skyl objektglassene grundigt under vandhanen, og lad dem lufttørre.
- Evaluer under mikroskop. Hvis der kræves dækglass, skal der anvendes vandigt monteringsmedie.

## RESULTATKARAKTERISTIKA

### BEDØMMELSESMETODE:

Scan filmen (900 X), og vælg et tyndt område, hvor erythrocyterne knapt rører hinanden. Steder med fosfataseaktivitet fremstår som blå eller røde granula, alt afhængigt af det anvendte farvestof. Vælg 100 efter hinanden følgende segmenterede og båndformede neutrofile granulocytter. Giv point fra 0 til 4+ på grundlag af den udfældede farves kvantitet og intensitet inden for disse cellers cytoplasma. Bedømmelses-karakteristikken fremgår af tabel 1. Summen af bedømmelsen af 100 celler er scoren.

TABEL 1. BEDØMMELSESKARAKTERISTIK\*

Udfældet azofarvestof i cytoplasma				
Celle-point	Mængde** (%)	Granulastørrelse	Farvnings-intensitet	Baggrund i cytoplasma
0+	Ingen	—	Ingen	Ingen
1+	50	Lille	Svag til moderat	Farveløs til meget lys lyserød eller blå
2+	50–80	Lille	Moderat til stærk	Farveløs til lys lyserød eller blå
3+	80–100	Middel til stor	Stærk	Farveløs til lyserød eller blå
4+	100	Middel og stor	Glansfuld	Ikke synlig

\* Tabel 1 repræsenterer en modificering af observationer foretaget af Kaplow.<sup>2,3</sup>

\*\* Procent cytoplasmamængde optaget af udfældet azofarvestof.

Scoren for alkalisk fosfataseaktivitet i leukocyter (LAPA) opnås ved at multiplicere det optalte antal celler med cellepointtallet. LAPA-scoren opnås ved at lægge disse tal sammen, som vist i følgende eksempel.

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

Følgende scorer fra 40 raske personer er blevet etableret hos Sigma-Aldrich vha. den beskrevne procedure.

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

SIGMA-ALDRICH, INC.  
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765  
Teknisk service: +1 314 771 3122  
eller e-mail [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
Bestilling: tlf. +1 314 771 5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Tyskland 49-7329-970

Det normale scoreområde er stort og går fra 20 til 180. Følgende scoreområde blev etableret for disse 40 normale personer:

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

Hvis de observerede resultater afviger fra de forventede, skal Sigma-Aldrich Technical Service kontaktes angående yderligere hjælp.

## HENVISNINGER

- 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
- Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed. DS Young, Editors, AACC Press, Washington (DC), 1990
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Parafilm er et registreret varemærke, der tilhører American Can Company, Greenwich, CT

Sigma-Aldrich, Inc. garanterer, at dets produkter stemmer overens med de oplysninger, som er indeholdt i denne og andre publikationer fra Sigma-Aldrich. Det påhviler køber at fastlægge produktets/produkternes egnethed til deres specifikke anvendelse. Yderligere vilkår og betingelser kan være gældende. Se bagsiden af faktura eller pakkeseddel angående yderligere vilkår og salgsbetingelser.

Procedure nr. 86  
Tidligere revision: 2003-02  
Revideret: 2003-09



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