

APLICACIÓN

El kit de fosfatasa ácida de Sigma-Aldrich se utiliza para la demostración citológica de la actividad de la fosfatasa ácida en leucocitos en improntas de sangre, médula ósea o tejido. Los reactivos de fosfatasa ácida son para uso diagnóstico *in vitro*.

El uso de naftol AS fosfato sustituido junto con sales de diazonio para la detección de fosfatasa ácida en leucocitos humanos fue informado por primera vez por Goldberg y Barka¹. El procedimiento de Sigma-Aldrich para la demostración de esta enzima leucocitaria se basa en el uso de naftol AS-BI fosfato y sal de Fast Garnet GBC. Este último componente de diazonio fue seleccionado porque se acopla rápidamente con un pH ácido, formando depósitos de tinte altamente insolubles. El ácido tartárico se utiliza para demostrar la presencia de fosfatasa ácida tartratoresistente.

Según el procedimiento de Sigma-Aldrich, los frotis de sangre se incuban en una solución de naftol AS-BI ácido fosfórico y Fast Garnet GBC. Los frotis duplicados se tratan con sustrato L(+) con contenido de tartrato. El naftol AS-BI, liberado por la hidrólisis enzimática, se acopla inmediatamente con Fast Garnet GBC, formando depósitos de tinte castaño insolubles en los puntos de actividad. Las células con fosfatasa ácida sensible al ácido tartárico están desprovistas de actividad, mientras que las células mononucleares con fosfatasa resistente al ácido tartárico no están afectadas por dicho tratamiento.

REACTIVOS

CONCENTRADO DE CITRATO, número de catálogo 386-1

Tampón citrato, 0,38 mol/l, pH 5,4 cuando se diluye según el procedimiento.

SOLUCIÓN DE TARTRATO, número de catálogo 386-2

L(+)-Tampón citrato, 0,67 mol/l, pH 5,2 cuando se diluye según el procedimiento.

SOLUCIÓN DE ACETATO, número de catálogo 386-3

Tampón acetato, 2,5 mol/l, pH 5,2 cuando se diluye según el procedimiento.

SOLUCIÓN DE NAFTOL AS-BI ÁCIDO FOSFÓRICO, número de catálogo 386-4

Naftol AS-BI ácido fosfórico, 12,5 mg/ml, en N,N'-dimetilformamida.

FAST GARNET GBC, número de catálogo 386-15

Fast Garnet GBC, purificada, 15 mg/cápsula.

SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA ÁCIDA, número de catálogo 285-2

Hematoxilina certificada, 1 g/l, yodato sódico, sulfato de amonio y aluminio, y estabilizantes, pH 3,3 a 25 °C.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacenar el concentrado de citrato, la solución de tartrato y la solución de acetato en el frigorífico (2–8 °C). Desechar si presenta turbidez.

Almacenar la sal de Fast Garnet GBC y la solución de naftol AS-BI ácido fosfórico en el frigorífico (2–8 °C). El color de la solución de naftol AS-BI ácido fosfórico puede variar de amarillo pálido a amarillo oscuro. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en los frascos.

Almacenar la solución de hematoxilina ácida a temperatura ambiente (18–26 °C). Desechar cuando el tiempo requerido para obtener la tinción adecuada supere en 5 minutos el tiempo recomendado en el procedimiento.

La solución de citrato diluida es adecuada para usar en ausencia de crecimiento microbiano evidente. La solución de citrato/acetona debe guardarse en un frasco herméticamente cerrado cuando no se esté usando. Las preparaciones deben ser del día.

PREPARACIÓN:

La solución de citrato diluida se prepara añadiendo 2,0 ml de concentrado de citrato, número de catálogo 386-1, a 18,0 ml de agua.

El fijador de citrato/acetona se prepara añadiendo 20,0 ml de solución de citrato diluida a 30,0 ml de acetona.

NOTA: La solución de citrato/acetona debe guardarse en un frasco herméticamente cerrado cuando no se esté usando. Las preparaciones deben ser del día.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consulte la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

La solución de citrato es **CORROSIVA**. Provoca quemaduras. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de tartrato es **IRRITANTE**. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

Solución de acetato. Precaución: Sustancia en proceso de prueba.

La solución de naftol AS-BI ácido fosfórico es **TÓXICA**. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Puede causar daños al feto. No inhalar los vapores. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Evitar la exposición – solicitar instrucciones especiales antes de su uso.

La sal de Fast Garnet GBC es **TÓXICA**. Puede causar cáncer. No inhalar el polvo. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Evitar la exposición – solicitar instrucciones especiales antes de su uso.

La hematoxilina ácida es **TÓXICA**. Tóxica en caso de ingestión. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La acetona es **INFLAMABLE e IRRITANTE**. Irritante para los ojos. Una exposición reiterada puede causar sequedad o grietas en la piel. Los vapores pueden causar somnolencia o mareo. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

La solución de citrato es **IRRITANTE**. Irritante para los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

La solución de tartrato es **IRRITANTE**. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

Solución de acetato. Precaución: Sustancia en proceso de prueba.

La solución de naftol AS-BI ácido fosfórico es **TÓXICA**. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Puede causar daños al feto. No inhalar los vapores. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Evitar la exposición – solicitar instrucciones especiales antes de su uso.

La sal de Fast Garnet GBC es **TÓXICA**. Puede causar cáncer. No inhalar el polvo. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Evitar la exposición – solicitar instrucciones especiales antes de su uso.

La hematoxilina ácida es **PERJUDICIAL**. Perjudicial en caso de ingestión.

La acetona es **ALTAMENTE INFLAMABLE e IRRITANTE**. Altamente inflamable. Irritante para los ojos. Una exposición reiterada puede causar sequedad o grietas en la piel. Los vapores pueden causar somnolencia o mareo. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica.

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA DE LA MUESTRA:

Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Pueden utilizarse frotis de sangre y médula ósea, improntas de tejidos y preparaciones citocentrífugas. Puede utilizarse EDTA o heparina como anticoagulante. Los frotis de sangre o médula ósea pueden almacenarse fijados a temperatura ambiente (18–26 °C) durante varias semanas, y sin fijar durante varios días, sin que se aprecien cambios de actividad². No enviar sangre total para ensayos a otros laboratorios. Enviar portaobjetos fijados o sin fijar. Los portaobjetos deben mantenerse frescos durante el traslado. Los frotis deben dejarse secar al menos 1 hora antes de su fijación.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Acetona, reactivo ACS, baño de agua a 37 °C

NOTAS:

El funcionamiento de la prueba puede ser controlado mediante la inclusión de frotis de sangre procedentes de individuos sanos. En ausencia de ácido tartárico, todos los leucocitos muestran granulación en los puntos de actividad. Cuando se incuban con tartrato, puede observarse granulación ocasional en los linfocitos, pero todas las demás células normales están desprovistas de actividad.

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

PROCEDIMIENTO:

Fijación:

1. Fijar el portaobjetos en solución de citrato/acetona durante 30 segundos a temperatura ambiente (18–26 °C).
2. Enjuagar **BREVEMENTE** los portaobjetos con agua desionizada y secar al aire durante al menos 15 minutos.

Tinción:

1. Etiquetar como A y B dos cubetas de 100 ml y añadir lo siguiente, mezclando después de cada adición:

	Cubeta A	Cubeta B
Agua, precalentada a 37 °C	46,0 ml	44,0 ml
Solución de acetato, número de catálogo 386-3	2,0 ml	2,0 ml
Naftol AS-BI ácido fosfórico, número de catálogo 386-4	2,0 ml	2,0 ml
Solución de tartrato, número de catálogo 386-2	—	2,0 ml

2. Añadir el contenido de 1 cápsula de sal de Fast Garnet GBC, número de catálogo 386-15, a cada cubeta. Mezclar en un mezclador magnético durante 30–60 segundos.
3. Filtrar rápidamente las soluciones con un papel Whatman N° 54 (o equivalente) y colocarlas en recipientes de tinción separados, debidamente etiquetados.
4. Calentar las soluciones en recipientes de tinción a 37 °C en un baño de agua. Comprobar que la temperatura sea de al menos 37 °C antes de añadir los portaobjetos.
5. Colocar al menos 2 duplicados de frotis de sangre fijados, en cada uno de los recipientes que contienen la solución de sustrato.
6. Incubar los portaobjetos durante 1 hora a 37 °C en la oscuridad.
7. Retirar los portaobjetos y lavarlos con agua desionizada durante 3 minutos.
8. Teñir en solución de hematoxilina ácida, número de catálogo 285-2, durante 5 minutos.
9. Enjuagar los portaobjetos con agua desionizada durante 3 minutos y secar al aire.
10. Realizar una evaluación microscópica utilizando una lente de inmersión de aceite (900X). No se recomienda utilizar un medio de montaje con base de disolvente ya que el mismo podría aclarar la tinción.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los frotis de sangre teñidos generalmente se evalúan subjetivamente para detectar la presencia o ausencia de enzimas tartratoresistentes. En ausencia de ácido tartárico, la mayoría de los leucocitos muestran granulación en los puntos de actividad. Cuando se incuban con tartrato, puede observarse una granulación ocasional en los linfocitos y en algunos macrófagos especializados, tales como la célula de Gaucher, las células epiteliales y las células pilosas³. En extensiones de sangre se observa una reacción positiva debido a la presencia de más de dos células con actividad difusa e intensa, es decir, más de 40 gránulos³. Para evaluar la tinción de Golgi, característica de los linfocitos derivados del timo (células T), se recomienda el procedimiento N° 181 de Sigma-Aldrich⁴.

La actividad de la fosfatasa ácida se manifiesta como gránulos de color apurpurado o rojo oscuro en el citoplasma de la mayoría de leucocitos.

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

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

REFERENCIAS

1. Goldberg AF, Barka T: Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature 189:297, 1962
2. Janckila A, Li CY et al: The cytochemistry of the tartrate-resistant acid phosphatase-technical considerations. Am J Clin Pathol 70:45, 1978
3. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 28, 119
4. Starkweather WH, Small GJ, Hill Sk: A systematic approach to the cytochemical classification of acute leukemia. IN Laboratory Perspectives, Roger Maler, Inc., Arlington (NJ), issue No. 5, 1985, p 2

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número 386
Revisión anterior: 2003-09
Revisión: 2005-01

 **EC REP** AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. +1 314 771 5765

Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122

o por correo electrónico a clintech@sial.com

Para pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

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