

APLICACIÓN

El kit de fosfatasa ácida de Sigma-Aldrich se utiliza para la demostración citológica de la fosfatasa ácida en leucocitos en improntas de sangre, médula ósea o tejido. Los reactivos de la 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 se basa en el uso de naftol AS-BI fosfato y sal de Fast Garnet GBC diazotada. Este último componente fue seleccionado debido a su rápido acoplamiento al pH ácido, formando depósitos de tinte altamente insolubles.

La mayoría de procedimientos, incluyendo los de Sigma-Aldrich, utilizan sales de diazonio estables. Estas se forman haciendo reaccionar una arilamina con nitrato sódico en un medio ácido². El cloruro de diazonio resultante (generalmente inestable) puede tratarse con compuestos tales 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 inhibidores². Por este motivo, ahora Sigma-Aldrich proporciona una solución estable para la base de Fast Garnet GBC y nitrato sódico para la citología de fosfatasa ácida. Para simplificar más este método, se incluye una solución acuosa estable de naftol AS-BI fosfato. La disponibilidad de estas soluciones estables permite a los usuarios ajustar los volúmenes de los reactivos de trabajo según sus necesidades, eliminando los residuos.

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 recién diazotada. Los frotis duplicados se tratan con una solución que contiene L(+)-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 contenido de ácido tartárico-fosfatasa ácidosensible están desprovistas de actividad. Las células mononucleares con contenido de ácido tartárico-fosfatasa ácidosensible no están afectadas por este tratamiento.

REACTIVOS

SOLUCIÓN DE NAFTOL AS-BI ÁCIDO FOSFÓRICO, número de catálogo 387-1
Naftol AS-BI ácido fosfórico, 12,5 mg/ml

SOLUCIÓN BASE DE FAST GARNET GBC, número de catálogo 387-2
Base de Fast Garnet GBC, 7,0 mg/ml, en 0,4 mol/l de ácido clorhídrico y estabilizador

SOLUCIÓN DE ACETATO, número de catálogo 386-3
Tampón acetato, 2,5 mol/l, pH 5,2 ± 0,1

SOLUCIÓN DE TARTRATO, número de catálogo 387-3
L(+)-tampón tartrato, 0,335 mol/l, pH 4,9 ± 0,1

SOLUCIÓN DE NITRITO SÓDICO, número de catálogo 91-4
Nitrito sódico, 0,1 mol/l

SOLUCIÓN DE CITRATO, número de catálogo 91-5
Ácido cítrico, 18 mmol/l, citrato sódico, 9 mmol/l, cloruro sódico, 12 mmol/l, y surfactante, pH 3,6 ± 0,1

SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA DE GILL N° 3, número de catálogo GHS-3
Hematoxilina certificada, 6,0 g/l, yodato sódico, 0,6 g/l, sulfato de aluminio, 52,8 g/l, y estabilizantes

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar la solución de hematoxilina a temperatura ambiente (18–26 °C). Proteger de la luz. La etiqueta del reactivo indica la fecha de caducidad.

Almacenar las soluciones base de naftol AS-BI ácido fosfórico, base de Fast Garnet GBC, acetato, tartrato, nitrito sódico y citrato a 2–8 °C.

Almacenar la solución fijadora en el frigorífico (2–8 °C). Calentar a 18–26 °C antes de su uso. La solución es estable hasta 2 meses si se almacena en el frigorífico, bien tapada. Desechar la solución fijadora si hay evidencia de evaporación, y preparar solución fresca.

DETERIORO:

Las soluciones de naftol AS-BI ácido fosfórico y tartrato deben desecharse si presentan turbidez.

La solución de citrato es adecuada para usar en ausencia de crecimiento microbiano.

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.

Preparar la solución fijadora combinando 25 ml de solución de citrato, 65 ml de acetona y 8 ml de formaldehído al 37 %. Colocarlo en una botella de vidrio bien tapada.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar 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 base de Fast Garnet GBC es TÓXICA. Perjudicial en caso de ingestión. Tóxica por inhalación. Provoca quemaduras. Puede causar cáncer. 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). Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

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

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. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

La solución de hematoxilina de Gill N° 3 es PERJUDICIAL. Perjudicial 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 protectora adecuada y protección para los ojos y el rostro. Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

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 alejada 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.

El formaldehído es TÓXICO. Tóxico por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por contacto con la piel. Puede causar daños genéticos hereditarios. 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). Utilizar sólo en zonas bien ventiladas.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

La solución base de Fast Garnet GBC es TÓXICA. Perjudicial en caso de ingestión. Puede causar cáncer. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

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

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. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

La solución de hematoxilina de Gill N° 3 es PERJUDICIAL. Perjudicial 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 protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

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 alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica.

El formaldehído es TÓXICO. Tóxico por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por contacto con la piel. 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). Utilizar sólo en zonas bien ventiladas.

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 muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Pueden utilizarse frotis de sangre y médula ósea, improntas de tejidos y preparaciones citocentrífugadas. 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 actividad³. No enviar sangre total para ensayos a otros laboratorios. Enviar los 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

Formaldehído, 37 %

NOTAS:

El funcionamiento de la prueba puede ser controlado mediante la inclusión de frotis de sangre procedentes de individuos sanos.

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:

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

1. Precalentar a 37 °C una cantidad suficiente de agua desionizada para todo un día. Comprobar la temperatura antes del uso.
2. Estabilizar la solución fijadora a temperatura ambiente (18–26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en solución fijadora durante 30 segundos. Aclarar bien con agua desionizada. No dejar que los portaobjetos se sequen.
3. Dispensar en 2 tubos de ensayo 0,5 ml de solución base de Fast Garnet GBC y 0,5 ml de solución de nitrito sódico, cada uno. Mezclar con cuidado mediante inversión durante 30 segundos. Dejar reposar durante 2 minutos.

4. Etiquetar como A y B dos cubetas de 100 ml y añadir lo siguiente, mezclando al mismo tiempo:

	Cubeta A	Cubeta B
Agua desionizada precalentada a 37 °C	45 ml	45 ml
Solución de Fast Garnet GBC diazotada del paso 3	1,0 ml	1,0 ml
Solución de naftol AS-BI fosfato	0,5 ml	0,5 ml
Solución de acetato	2,0 ml	2,0 ml
Solución de tartrato	—	1,0 ml

5. Etiquetar como A y B dos vasos de Coplin y transferir a ellos las soluciones de las cubetas correspondientes. Calentar las soluciones de los vasos a 37 °C en un baño de agua. Comprobar que la temperatura sea de al menos 37 °C antes de añadir los portaobjetos.
6. Introducir los portaobjetos en los vasos de Coplin e incubar durante 1 hora en un baño de agua a 37 °C, protegidos de la luz.
7. Después de 1 hora, aclarar bien los portaobjetos con agua desionizada y contrateñir durante 2 minutos en solución de hematoxilina de Gill N° 3.
8. Aclarar los portaobjetos con agua alcalina del grifo durante varios minutos para azular los núcleos.
9. Secar los portaobjetos al aire y examinarlos con el microscopio. No es recomendable cubrirlos ya que el tinte se decolora con el tiempo.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

RESULTADOS:

Los frotis de sangre teñidos generalmente se evalúan subjetivamente para detectar la presencia o ausencia de enzimas tartratorresistentes. 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 pilosas⁴. 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 gránulos⁴. Para evaluar la tinción de Golgi, característica de los linfocitos derivados del timo (células T), se recomienda el procedimiento N° 181 de Sigma-Aldrich⁵.

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

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. Burstone MS: In Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
3. Janckila A, Li CY, et al: the cytochemistry of the tartrate-resistant acid phosphatase – Technical considerations. Am J Clin Pathol 70:45, 1978
4. Sun T: Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1985, pp 28, 119
5. 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 387
Revisión anterior: 2003-02
Revisión: 2003-09



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 realizar 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