

APLICACIÓN

La Peroxidasa leucocitaria (Mieloperoxidasa) de Sigma-Aldrich se utiliza para la demostración histoquímica en peroxidasa leucocitaria. Los reactivos de peroxidasa leucocitaria son para uso diagnóstico *in vitro*.

Los métodos clásicos de la localización citoquímica de la mieloperoxidasa (MP) incluyen el uso de benzidina¹ o diaminobenzidina². En 1977, Hanker y cols.³ describieron el uso de p-fenilenediamina y catecol para detectar la peroxidasa de rábano inyectada. Este sistema indicador es la base del procedimiento de Sigma-Aldrich al detectar la mieloperoxidasa por medio de la siguiente reacción:



REACTIVOS

TAMPÓN TRIZMAL™ 6,3 CONCENTRADO, número de catálogo 90-3C
TRIZMA®-maleato, 200 mmol/l, con cloroformo como conservante.

REACTIVO INDICADOR DE PEROXIDASA, número de catálogo M 390-1
p-fenilenediamina diHCl (1 parte) y catecol (2 partes).

SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA ÁCIDA, número de catálogo 285-2
Hematoxilina certificada, 1 g/l, pH 3,3 a 25 °C.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar el tampón Trizmal™ 6,3 concentrado y la solución de hematoxilina ácida a temperatura ambiente (18–26 °C).

El reactivo indicador de peroxidasa debe almacenarse refrigerado (2–8 °C).

La solución de hematoxilina ácida no debe devolverse al recipiente original después de su uso en un vaso de Coplin.

El peróxido de hidrógeno al 3 % en una solución salina tamponada con fosfato debe guardarse en el frigorífico (2–8 °C). Desechar si presenta turbidez.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad.

DETERIORO:

Desechar el tampón Trizmal™ 6,3 concentrado si presenta turbidez.

Desechar la solución de hematoxilina ácida cuando el tiempo requerido para obtener la tinción adecuada supere en más de 5 minutos el tiempo recomendado en el procedimiento.

PREPARACIÓN:

El tampón Trizmal™ 6,3 diluido se prepara mezclando 1 volumen de tampón TRIZMAL™ 6,3 concentrado, número de catálogo 90-3C, con 9 volúmenes de agua desionizada. Utilizar una sola vez y desecharlo.

La solución fijadora de etanol, 95 % (v/v), se prepara mezclando 5 ml de formaldehído al 37 % con 45 ml de etanol al 95 %. Las preparaciones deben ser del día. Mantenga el envase bien cerrado.

El peróxido de hidrógeno al 3 % en una solución salina tamponada con fosfato se prepara añadiendo 1 parte de peróxido de hidrógeno, 30 %, a 9 partes de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Debe prepararse al momento.

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.)

El reactivo indicador de peroxidasa es TÓXICO. Tóxico por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Evidencia escasa de un efecto carcinógeno. Puede causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. Peligroso para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. 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). Este material y su envase deben desecharse como residuos peligrosos. Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

El tampón TRIZMAL™ concentrado es PERJUDICIAL y peligroso para el medio ambiente. Perjudicial en caso de ingestión. Evidencia escasa de un efecto carcinógeno. Perjudicial: peligro de daños graves a la salud por exposición prolongada, inhalación o ingestión. Llevar ropa protectora adecuada.

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). Órganos a los que afecta: nervios e hígado.

El formaldehído es TÓXICO. Tóxico por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Puede causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. Evidencia escasa de un efecto carcinógeno. 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.

El etanol es INFLAMABLE e IRRITANTE. Altamente inflamable. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

El peróxido de hidrógeno al 30 % es OXIDANTE y CORROSIVO. En contacto con combustible puede provocar incendio. Provoca quemaduras. Mantener lejos del material combustible. 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).

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

El reactivo indicador de peroxidasa es TÓXICO y peligroso para el medio ambiente. Tóxico por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos y la piel. Puede causar sensibilización por contacto con la piel. Peligroso para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. 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). Este material y su envase deben desecharse como residuos peligrosos. Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

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

El formaldehído es TÓXICO. Tóxico por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de un efecto carcinógeno. 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.

El etanol es ALTAMENTE INFLAMABLE. Altamente inflamable. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar.

El peróxido de hidrógeno es CORROSIVO. Provoca quemaduras. En caso de contacto con la piel, lavar inmediatamente con agua abundante. Usar ropa protectora adecuada 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).

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.

Para el ensayo deben utilizarse frotis de sangre total o de médula ósea recién preparados. La sangre puede recogerse en heparina o EDTA. Debe reducirse al mínimo la exposición a la luz ya que la peroxidasa leucocitaria es fotosensible. Los frotis sin fijar son estables durante 3 semanas si se guardan en la oscuridad. Antes de la fijación, los frotis deben dejarse al aire durante 10 minutos, protegidos de la luz.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Solución de formaldehído, 37 %

Etanol, 95 % (v/v)

Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, número de catálogo P 3813

Peróxido de hidrógeno, 30 %

NOTAS:

A efectos de comprobación del funcionamiento del sistema, se recomienda procesar los frotis de sangre procedentes de donantes sanos junto con las muestras de paciente.

Aunque la mieloperoxidasa generalmente se considera un marcador de células de alineación mielocítica, es obligatorio reconocer que las células monocitoides también pueden mostrar actividad leve de peroxidasa.

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:

1. Fijar los frotis a temperatura ambiente durante 30 segundos con **solución fijadora**.
2. Lavar los portaobjetos con agua corriente a chorro suave durante 2 minutos y secar al aire durante 10 minutos, en la oscuridad.
3. **Precalentar 50 ml de tampón TRIZMAL™ 6,3 diluido**, en un baño de agua a 37 °C.
4. Inmediatamente antes de su uso, añadir 1 vial de reactivo indicador de peroxidasa, número de catálogo 390-1, y 200 µl (0,2 ml) de peróxido de hidrógeno al 3 %, al tampón Trizmal™ 6,3 diluido precalentado. Mezclar a conciencia. Desechar después de su uso.

5. Colocar los portaobjetos lavados, fijados (paso 2) con solución de reactivo indicador de peroxidasa (paso 4) durante 30 minutos, en un baño de agua a 37 °C, en la oscuridad.
6. Tras la incubación, lavar los portaobjetos con agua corriente a chorro suave durante 15–30 segundos y dejarlos secar.
7. Contrateñir los portaobjetos con solución de hematoxilina ácida, número de catálogo 285-2, durante 10 minutos.
8. Aclarar los portaobjetos en agua desionizada corriente durante 15–30 segundos. Secar los portaobjetos al aire y examinarlos con el microscopio.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los frotis de sangre procedentes de donantes normales se tiñeron para mieloperoxidasa de acuerdo con este procedimiento y mediante el método de benzidina¹. Los neutrófilos mostraron una granulación marrón-negra con este procedimiento, y una granulación azul con el procedimiento de benzidina. En ambos casos, los monocitos se tiñeron menos intensamente y los linfocitos no mostraron ninguna actividad de mieloperoxidasa.

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

REFERENCIAS

1. Kaplow SL: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood 26:215, 1965.
2. Graham RC, Karnovsky MJ: The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14:291, 1966.
3. Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A: A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem 9:789, 1977.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Randrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. Brit J Haematol 33:451, 1976.
5. Marmont AM, Damasio E, Zucker-Franklin D: Neutrophils. In Atlas of Blood Cells-Function and Pathology, Vol. 1. Edited by D Zucker-Franklin, MF Greaves, CE Grossi, AM Marmont, Lea and Febriger, Philadelphia, 1981, pp 149-424.

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 390
Revisión anterior: 2003-03
Revisión: 2003-09



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