

APLICACIÓN

Los kits de fosfatasa alcalina de Sigma-Aldrich se utilizan para la demostración histoquímica semicuantitativa de la actividad de la fosfatasa alcalina en leucocitos. Los reactivos de la fosfatasa alcalina son para uso diagnóstico *in vitro*.

En 1929, Kay fue el primero en sugerir la presencia de fosfatasa alcalina en leucocitos¹. Sin embargo, no fue sino hasta muchos años más tarde que Kaplow² introdujo un método de tinción práctico para la demostración de enzimas leucocitarias. Kaplow² utilizó sodio α -naftil fosfato como sustrato y Fast Blue RR como sal de diazonio, y recomendó un método para comparaciones semicuantitativas. También se sugirieron mejoras para la buena conservación de la morfología celular. Consecuentemente, el α -naftil fosfato fue sustituido por naftol AS fosfato. Es importante mencionar que se ha encontrado una buena correlación entre las técnicas citoquímicas y bioquímicas para el ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria (LAPA)³.

Con el método de Sigma-Aldrich, que es esencialmente el de Ackerman⁴, la fosfatasa alcalina leucocitaria se determina en frotis de sangre o médula ósea tras la fijación de éstos en portaobjetos. Los frotis fijados se incuban en una solución con contenido de naftol AS-MX fosfato. Como resultado de la actividad de la fosfatasa, el naftol AS-MX es liberado e inmediatamente acoplado con sal de diazonio, formando un pigmento insoluble visible en los puntos de actividad de la fosfatasa.

REACTIVO

SAL FAST BLUE RR, número de catálogo FBS-25

Cápsulas ya pesadas. El peso de cada cápsula puede variar con la pureza del lote de tinción, y ha sido optimizado según el análisis.

SAL FAST VIOLET B, número de catálogo 85-1

Cápsulas de 12 mg, ya pesadas.

SOLUCIÓN DE NAFTOL AS-MX FOSFATO ALCALINA, número de catálogo 85-5

Naftol AS-MX fosfato, 0,25 % (p/v), en tampón a pH 8,6 y 25 °C.

SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA DE MAYER, número de catálogo MHS-1

Hematoxilina certificada, 1 g/l, yodato sódico, 0,2 g/l, hidróxido de aluminio y amonio, 5 g/l, y estabilizantes.

SOLUCIÓN DE CITRATO CONCENTRADA, número de catálogo 85-4C

Contiene ácido cítrico-citrato sódico, 1,5 mol/l.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar las sales de Fast Blue RR y Fast Violet B a una temperatura inferior a 0 °C. Almacenar la solución de naftol AS-MX fosfato alcalina en el frigorífico (2–8 °C). Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad.

Almacenar la solución de hematoxilina de Mayer bien cerrada, a temperatura ambiente (18–26 °C). No devolver la solución al envase original después de su uso en un vaso de Coplin. Desechar la solución cuando el tiempo requerido para obtener la tinción adecuada supere en más de 5 minutos el tiempo recomendado en el procedimiento.

Almacenar la solución de citrato concentrado a temperatura ambiente (18–26 °C). Almacenar la solución de trabajo de citrato en el frigorífico (2–8 °C). Las soluciones de citrato son adecuadas para usar en ausencia de crecimiento microbiano.

PREPARACIÓN:

Las sales de Fast Blue RR y Fast Violet B, la solución de naftol AS-MX fosfato alcalina y la solución de hematoxilina de Mayer se suministran listas para su uso en el procedimiento.

Preparar la SOLUCIÓN DE TRABAJO DE CITRATO diluyendo 2 ml de solución de citrato concentrado a 100 ml de agua desionizada.

Para preparar la SOLUCIÓN FIJADORA (acetona tamponada con citrato, 60 %), calentar la solución de trabajo de citrato a temperatura ambiente (18–26 °C). Removiendo constantemente, añadir 2 partes de solución de trabajo de citrato a 3 partes de acetona. Desechar después de su uso.

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.)

Sales de Fast Blue RR y Fast Violet B, y naftol AS-MX fosfato. Precaución: Evitar el contacto y la inhalación.

La solución de hematoxilina de Mayer 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.

Concentrado de Scott sustituto del agua corriente. Precaución: sustancia en proceso de prueba.

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.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

Sales de Fast Blue RR y Fast Violet B: No inhalar el polvo. Evitar el contacto con la piel y los ojos.

La solución de hematoxilina de Mayer es perjudicial. Perjudicial en caso de ingestión.

Concentrado de Scott sustituto del agua corriente. Precaución: sustancia en proceso de prueba.

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.

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 o médula ósea frescos o muestras anticoaguladas con heparina⁵. EVITAR EL USO DE EDTA⁵. Las extensiones de sangre deben teñirse para determinar la actividad enzimática dentro de las 8 horas a partir de su preparación. Sin embargo, si esto no fuera posible, la pérdida gradual de la actividad de la fosfatasa alcalina puede retrasarse mediante fijación y almacenamiento en congelador durante la noche⁶. Los frotis deben dejarse secar al menos durante 1 hora antes de la fijación, y durante 3 horas tras la fijación y antes de la congelación.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

CONCENTRADO DE SCOTT SUSTITUTO DEL AGUA CORRIENTE, número de catálogo S 5134

Sulfato de magnesio • 7H₂O, 200 g/l, bicarbonato sódico, 20 g/l, y conservante.

REACTIVO: ACETONA, grado ACS

NOTAS:

Hay escasez de datos en relación con los compuestos susceptibles de interferir con la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria (LAPA). Se sabe que determinados fármacos y otras sustancias afectan a la actividad de la fosfatasa alcalina circulante⁶. Los contraceptivos orales, el cortisol y el estrés pueden provocar elevados niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria⁷.

Realizar el procedimiento utilizando controles positivos. Éstos pueden obtenerse de pacientes con leucocitosis piogénica o de mujeres en el tercer trimestre de embarazo o durante los primeros días postparto. Las puntuaciones de la fosfatasa alcalina leucocitaria de estas personas generalmente pasan de 100. Puede prepararse un control negativo de una extensión normal fijada, sumergiendo ésta en agua hirviendo durante 1 minuto para inactivar la enzima. Los frotis de control pueden conservarse hasta 1 año si se almacenan fijados y envueltos en Parafilm a -70 °C. Estos frotis deben dejarse secar al menos durante 1 hora antes de la fijación, y durante 3 horas tras la fijación y antes de la congelación.

El procedimiento depende de la evaluación subjetiva de las células teñidas, por lo que pueden obtenerse varios resultados. La temperatura de la mezcla de reacción debe mantenerse entre 18–26 °C. Las temperaturas más bajas darán como resultado puntuaciones significativamente más bajas. Por encima de 30 °C, se producirán marcados aumentos de la actividad. Los eosinófilos no se tiñen, pero pueden reconocerse por los núcleos bilobulados y los gránulos refráctiles.

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. Medir 48 ml de agua destilada en un recipiente adecuado y ajustar la temperatura a 18–26 °C.
2. Preparar la solución de sal de diazonio: Disolver el contenido de una cápsula de sales de Fast Blue RR o de Fast Violet B en agua destilada (paso 1). Puede utilizarse un mezclador magnético.
3. Añadir 2 ml de solución de naftol AS-MX fosfato alcalina a la solución de sal de diazonio diluida (paso 2). Mezclar.
4. Llevar la solución fijadora a temperatura ambiente (18–26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en acetona tamponada con citrato durante 30 segundos. Aclararlos suavemente con agua desionizada durante 45 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
5. Colocar los portaobjetos en la mezcla de tinte alcalino (paso 3) e incubar a 18–26 °C durante 30 minutos. Proteger los portaobjetos sumergidos de la luz directa. Desechar la mezcla de tinte alcalino después de su uso.
6. Después de 30 minutos, extraer los portaobjetos y aclararlos bien con agua desionizada durante 2 minutos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
7. Colocar los portaobjetos en solución de hematoxilina de Mayer durante 10 minutos.

NOTA: Si se utiliza sal de Fast Blue RR, aclarar los portaobjetos contrateñidos durante 3 minutos en agua desionizada. El resultado será una tinción nuclear rojo violeta. Si se utiliza sal de Fast Violet B, aclarar los portaobjetos contrateñidos con agua del grifo (si es alcalina) o sumergirlos en sustituto del agua del grifo Scott durante 2 minutos. El resultado será una tinción nuclear azul.

8. Comprobar con el microscopio. Si es necesario cubrirlos, utilizar sólo un medio de montaje acuoso.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

MÉTODO DE PuntuACIÓN:

Explorar el frotis (900X) y seleccionar una zona fina en la que los eritrocitos apenas se toquen. Los puntos de actividad de la fosfatasa aparecerán como gránulos azules o rojos, según el tinte utilizado. Seleccionar 100 granulocitos neutrofilicos en forma de banda, consecutivos y segmentados. Puntuar entre 0 y 4+ basándose en la cantidad e intensidad de la tinción precipitada dentro del citoplasma de estas células. La tabla 1 indica los criterios de puntuación. La suma de las evaluaciones de 100 células se considera como la puntuación.

TABLA 1. CRITERIOS DE PuntuACIÓN*

Tinte azoico precipitado en citoplasma				
Puntuación de las células	Cantidad** (%)	Tamaño del gránulo	Intensidad de tinción	Fondo del citoplasma
0+	Ninguna	—	Ninguna	Ninguno
1+	50	Pequeña	De débil a moderada	De incoloro a rosa muy pálido o azul
2+	50–80	Pequeña	De moderada a fuerte	De incoloro a rosa pálido o azul
3+	80–100	De media a grande	Fuerte	De incoloro a rosa o azul
4+	100	Media y grande	Muy fuerte	Invisible

* La tabla 1 representa la modificación de las observaciones realizadas por Kaplow^{2,3}.

** Porcentaje del volumen del citoplasma ocupado por el precipitado de tinte azoico.

Para obtener la puntuación de la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria (LAPA), el número de células contadas se multiplica por el valor de puntuación de las células. Estas cifras deben sumarse para obtener la puntuación de LAPA, según se muestra en los siguientes ejemplos:

Puntuación de las células	Número contado	Puntuación LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

VALORES ESPERADOS:

Sigma-Aldrich obtuvo las siguientes puntuaciones de 20 individuos normales. La sangre se introdujo en tubos heparinizados y se prepararon los frotis dentro de una hora.

	<u>Fast Blue RR</u>	<u>Fast Violet B</u>
Media de LAPA ± 1 DT	96 ± 44	72 ± 50
Intervalo de LAPA	52–140	22–122

El intervalo de las puntuaciones normales es amplio, variando de 12 a 182. De esos 20 individuos normales, se obtuvo el siguiente intervalo de puntuación:

<u>Fast Blue RR</u>	<u>Fast Violet B</u>
32–182	12–180

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios márgenes normales.

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

OBSERVACIONES ESPERADAS:

En los seres humanos, la actividad de la fosfatasa alcalina está limitada a granulocitos maduros y en forma de banda. Ocasionalmente puede observarse una tinción débil en los linfocitos. La tinción es más fuerte en los osteoblastos de médula ósea y en las células endoteliales. Se observa un marcado aumento de la fosfatasa alcalina leucocitaria de la sangre periférica en varios mielomas, enfermedad de Hodgkin, policitemia vera y leucocitosis infecciosa. Se observa una actividad baja o nula en la leucemia mielocítica crónica, hipofosfatasa hereditaria, y hemoglobulinuria nocturna paroxística.

Se preparó una serie de portaobjetos utilizando sangre obtenida de sujetos normales, mujeres en el último trimestre de embarazo, mujeres en los primeros días posparto, e individuos que presentan una reacción leucemoide. Los controles negativos se prepararon mediante inactivación por calor, según se ha descrito. Se repitieron varias combinaciones (Fast Blue RR y Fast Violet B) y contratiñiciones (soluciones de azul de metileno y hematoxilina de Mayer) y se evaluó la puntuación de LAPA. Los valores obtenidos en varios portaobjetos preparados de cada sujeto fueron muy parecidos y no parecían estar influenciados por la técnica de tinción/contratiñición empleada. Por ejemplo, 7 extensiones de sangre procedentes de un paciente prenatal dieron puntuaciones entre 235 y 269 con una media, una desviación típica y un coeficiente de variación de 255, 11,3 y 4,4 %, respectivamente. Los controles negativos revelaron una ausencia total de material teñido.

REFERENCIAS

- 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
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann NY Acad Sci 155:911, 1968
- Ackerman GA: Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the localization of leukocyte alkaline phosphatase activity. Lab Invest 11:563, 1962
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS: Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACC Press, Washington D.C., 1990; Supplement No. 1, 1991
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

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 85
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