

## 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 tejido hematopoyético, la fosfatasa alcalina aparece restringida a neutrófilos en banda y segmentados<sup>1-2</sup>. Su demostración mediante la captura simultánea con naftoles sustituidos y sales de diazonio es, tal vez, el primer ejemplo de ensayo enzimático citoquímico con significancia clínica<sup>3</sup>.

La mayoría de procedimientos, incluyendo los de Sigma-Aldrich, utilizan sales de diazonio estables. Éstas se forman haciendo reaccionar una arilamina con nitrilo sódico en un medio ácido<sup>4</sup>. 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 inhibidores<sup>4</sup>. Por este motivo, ahora Sigma-Aldrich proporciona soluciones estables de base de Fast Red Violet LB, base de Fast Blue BB y nitrilo sódico para la citoquímica de fosfatasa alcalina. Para simplificar más estos métodos, se incluye una solución estable de naftol AS-BI fosfato.

Para realizar el ensayo, se incuban frotis de sangre fijados, a temperatura ambiente (18–26 °C), en una solución con contenido de naftol AS-BI fosfato y sal de Fast Red Violet LB o Fast Blue BB, recién preparadas, tamponadas a pH 9,5 con 2-amino-2-metil-1,3-propanediol (AMPD). Los puntos de actividad son rojos o azules según la selección de la sal de diazonio. El procedimiento con Fast Red Violet LB es similar a un método de referencia propuesto por la NCCLS<sup>5</sup>.

## REACTIVOS

### SOLUCIÓN DE NAFTOL AS-BI ALCALINA, número de catálogo 86-1

Naftol AS-BI fosfato, 4 mg/ml, en tampón AMPD, 2 mol/l, pH 9,5

### SOLUCIÓN FRV ALCALINA, número de catálogo 86-2

Base de Fast Red Violet LB, 5 mg/ml, en 0,4 mol/l de ácido clorhídrico y estabilizante

### SOLUCIÓN FBB ALCALINA, número de catálogo 86-3

Base de Fast Blue BB, 5 mg/ml, en 0,4 mol/l de ácido clorhídrico y estabilizante

### SOLUCIÓN DE NITRITO SÓDICO, número de catálogo 91-4

Nitrilo 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, tamponado a pH 3,6

### 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

### SOLUCIÓN DE ROJO NEUTRO TAMPONADA, número de catálogo N 6264

Rojo neutro, certificado, 0,5 % (p/v), en tampón acetato, pH 5,2. Contiene conservante.

### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar las soluciones de naftol AS-BI alcalina, FRV alcalina, FBB alcalina, y nitrilo sódico en el frigorífico (2–8 °C). Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad.

Almacenar la solución de citrato en el frigorífico (2–8 °C). La solución es adecuada para usar en ausencia de crecimiento microbiano.

Almacenar las soluciones de hematoxilina y rojo neutro a temperatura ambiente (18–26 °C). Proteger la solución de hematoxilina de la luz. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad.

### DETERIORO:

Desechar si la solución de hematoxilina se vuelve marrón (sobreoxidación por aire) o púrpura (pérdida de acidez).

### PREPARACIÓN:

Los reactivos se suministran listos para su uso.

**FIJADOR DE CITRATO-ACETONA-FORMALDEHÍDO:** A 25 ml de solución de citrato, número de catálogo 91-5, añadir 65 ml de acetona y 8 ml de formaldehído al 37 %. Colocarlo en una botella de vidrio bien tapada. Almacenar en el frigorífico (2–8 °C). Calentar a 18–26 °C antes de su uso. Estable hasta 4 semanas si se almacena en el frigorífico, 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.)

Soluciones de naftol AS-BI alcalina y rojo neutro. Precaución: sustancia en proceso de prueba.

La solución FRV alcalina es **CORROSIVA**. Perjudicial en caso de ingestión. Tóxica por inhalación. 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). Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

La solución FBB alcalina es **TÓXICA**. Tóxica por inhalación. 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). Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

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. 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.

La solución de formaldehído es **TÓXICA**. Tóxica 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.)

Soluciones de naftol AS-BI alcalina y rojo neutro. Precaución: sustancia en proceso de prueba.

Las soluciones FRV alcalina y FBB alcalina son **PERJUDICIALES**. Perjudiciales en caso de ingestión. Llevar ropa protectora adecuada.

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. Llevar ropa protectora adecuada.

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.

La solución de formaldehído es **TÓXICA**. Tóxica 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 o médula ósea frescos o muestras anticoaguladas con heparina<sup>6</sup>. EVITAR EL USO DE EDTA<sup>6</sup>. 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 noche<sup>5</sup>. 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:

ACETONA, reactivo ACS  
FORMALDEHÍDO, 37 % ACS

### NOTAS:

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 posparto. 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.

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios márgenes esperados, según la población a la que atiende.

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.

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 circulante<sup>6</sup>. Los contraceptivos orales, el cortisol y el estrés pueden provocar elevados niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria<sup>6</sup>.

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.

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:

NOTA: Para uso con vasos de Columbia, dividir los volúmenes de los reactivos por 5.

1. Medir 45 ml de agua desionizada y ajustar la temperatura a 18–26 °C.
2. Preparar la solución de sal de diazonio:  
Añadir 1 ml de solución de nitrito sódico a 1 ml de solución FRV alcalina.  
O BIEN  
Añadir 1 ml de solución de nitrito sódico a 1 ml de solución FBB alcalina.  
Mezclar con cuidado mediante inversión. Dejar reposar durante 2 minutos.
3. Añadir la solución preparada en el paso 2 al agua desionizada del paso 1.
4. Añadir 1 ml de solución de naftol AS-BI alcalina a la solución de sal de diazonio diluida (paso 3). Mezclar bien y decantar en un vaso de Coplin.
5. Estabilizar la solución de citrato-acetona-formaldehído a temperatura ambiente (18–26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en solución fijadora durante 30 segundos. Aclararlos suavemente con agua desionizada durante 45 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
6. Colocar los portaobjetos en la mezcla de tinte alcalino (paso 4) e incubar a 18-26 °C durante 15 minutos. Proteger los portaobjetos sumergidos de la luz directa. Desechar la mezcla de tinte alcalino después de su uso.
7. Después de 15 minutos de incubación, extraer los portaobjetos del vaso de Coplin y aclararlos con agua desionizada durante 2 minutos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
8. Contrateñir durante 2 minutos. Si se utiliza la solución FRV alcalina, contrateñir con solución de hematoxilina de Gill N° 3. Si se utiliza la solución FBB alcalina, contrateñir con solución de rojo neutro tamponada.
9. Aclarar bien los portaobjetos con agua del grifo y secar al aire.
10. 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				
Evaluación 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<sup>2,3</sup>.

\*\* 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

Utilizando el procedimiento descrito, Sigma-Aldrich obtuvo las siguientes puntuaciones de 40 individuos sanos.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Media de LAPA ± 1 DT	76 ± 31	94 ± 39
Intervalo de LAPA	44–106	55–133

El intervalo de las puntuaciones normales es amplio, variando de 20 a 180. De esos 40 individuos normales, se obtuvo el siguiente intervalo de puntuación:

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

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

## REFERENCIAS

1. Kay HD: Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of the bone. Br J Exp Pathol 10:253, 1929
2. Kaplow LS: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10:1023, 1955
3. Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248–250
4. Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88–113
5. Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
6. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed. DS Young, Editors, AACC Press, Washington (DC), 1990
7. Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Parafilm es marca registrada de American Can Company, Greenwich, CT, EE.UU.

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 86  
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: +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