

POUŽITÍ

Kit alkalické fosfatázy Sigma-Aldrich Alkaline Phosphatase je určen pro histochemickou semikvantitativní demonstraci aktivity alkalické fosfatázy v leukocytech. Reagencie alkalické fosfatázy jsou určeny k "diagnostice in vitro."

V hematopoietické tkáni se alkalická fosfatáza omezuje pouze na pásy tvořící a segmentované neutrofile.¹⁻² Její demonstrace současným zachytáváním substituovaných naftolů a diazoniových solí, je zřejmě nejranější příklad cytochemického enzymatického testu klinické důležitosti.³

Většina postupů, včetně těch, které provádí Sigma-Aldrich, využívají stabilní diazoniové sole. Ty se vytvářejí reakcí arylaminu s nitridem sodným v kyselém médiu.⁴ Výsledný diazochlorid (obvykle nestabilní) lze upravovat sloučeninami, jako například chloridem zinečnatým, síranem zinečnatým nebo např. 1,6-disulfonátem, vytvářejících stabilní sole. Tyto stabilizátory využívají výrazné inhibice některých enzymatických systémů, přičemž diazochloridy jsou méně inhibiční.⁴ Proto společnost Sigma-Aldrich nyní poskytuje stabilní roztoky fast red violet LB báze, fast blue BB báze a nitríd sodný pro cytochemii alkalické fosfatázy. Pro další zjednodušení těchto metod je připojen stabilní roztok naftol AS-BI fosfát.

Test se provádí inkubováním fixovaných krevních filmů při pokojové teplotě (18-26 °C) v roztoku s obsahem naftol AS-BI fosfátu a čerstvě připravené soli fast red violet LB nebo soli fast blue BB pufované při pH 9,5 2-amino-2-methyl-1,3-propanediolom (AMPD). Aktivní oblasti jsou buď červené nebo modré v závislosti na zvolené diazoniové soli. Postup zahrnující barvivo fast red violet LB je podobný referenční metodě navrhované NCCLS.⁵

REAGENCIE

ALKALICKÝ ROZTOK NAFTOLU AS-BI, katalogové č. 86-1
Naftol AS-BI fosfát, 4 mg/mL, v pufru AMPD, 2 mol/l, pH 9,5.

ALKALICKÝ ROZTOK FRV, katalogové č. 86-2

Fast red violet LB báze, 5 mg/mL, v kyselině chlorovodíkové, 0,4 mol/l, se stabilizátorem.

ALKALICKÝ ROZTOK FBB, katalogové č. 86-3

Fast blue BB báze, 5 mg/mL, v kyselině chlorovodíkové, 0,4 mol/l, se stabilizátorem.

ROZTOK NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 91-4

Nitríd sodný, 0,1 mol/l.

CITRÁTOVÝ ROZTOK, katalogové č. 91-5

Kyselina citrónová, 18 mmol/l, citrát sodný, 9 mmol/l, chlorid sodný, 12 mmol/l s detergentem, pufovaný při pH 3,6.

HEMATOXYLIN SOLUTION, GILL NO. 3, Katalogové č. GHS-3

Certifikovaný hematoxylin, 6,0 g/l, jodičnan sodný, 0,6 g/l, hydroxid hlinito-amonný, 52,8 g/l a stabilizátory.

NEUTRÁLNÍ ROZTOK ČERVENĚ, PUFROVANÝ, katalogové č. N 6264

Neutrální červeně, certifikovaná, 0,5 % w/v, v acetátovém pufru, pH 5,2. Příklad konzervačního činidla.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte alkalický roztok naftolu AS-BI, alkalický roztok FRV, alkalický roztok FBB a roztok nitridu sodného v lednici (2-8 °C). Reagencie jsou stabilní do data použitelnosti.

Pracovní roztok citrátu skladujte v lednici (2-8 °C). Roztok citrátu je vhodný pro použití bez viditelného mikrobiálního růstu.

Skladujte roztok hematoxylinu a neutrální roztok červeně při pokojové teplotě (18-26 °C). Chraňte roztok hematoxylinu před světlem. Reagencie jsou stabilní do data použitelnosti.

ZHORŠENÍ:

Zlikvidujte, pokud roztok zžhněde (oxidací vzduchem) nebo zrudne (ztráta kyselosti).

PŘÍPRAVA:

Reagencie jsou dodávána připravená k okamžitému použití.

FIXATIVUM – CITRÁT-ACETONOVÝ FORMALDEHYD: K 25 mL citrátového roztoku, katalogové č. 91-5, přidejte 65 mL acetonu a 8 mL 37 % formaldehydu. Umístěte do skleněné láhve a pevně uzavřete. Skladujte v lednici (2-8 °C). Před použitím zahřejte na 18-26 °C. Roztok je stabilní až 4 týdny, je-li skladován těsně uzavřen v lednici.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenciemi. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Alkalický roztok naftolu AS-BI a neutrální roztok červeně. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Alkalický roztok FRV je ŽÍRAVÝ. Škodlivý při požití. Při vdechnutí jedovatý. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Alkalický roztok FBB je TOXICKÝ. Při vdechnutí jedovatý. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Roztok Hematoxylin Gill 3 je ŠKODLIVÝ. Škodlivý při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Aceton je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit otupělost a závratě. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Roztok formaldehydu je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit precitlivělost kontaktem s pokožkou. Může způsobit dědičné genetické poškození. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Alkalický roztok naftolu AS-BI a neutrální roztok červeně. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Alkalické roztoky FRV a FBB jsou ŠKODLIVÉ. Škodlivé při požití. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Roztok Hematoxylin Gill 3 je ŠKODLIVÝ. Škodlivý při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Aceton je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit otupělost a závratě. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

Roztok formaldehydu je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit precitlivělost kontaktem s pokožkou. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Lze použít čerstvé krevní filmy a filmy kostní dřené nebo vzorky antikoagulované heparinem.⁵ NEPOUŽÍVEJTE EDTA.⁵ Krevní nátěry je třeba barvit na enzymovou aktivitu během 8 hodin od přípravy. Avšak, není-li to možné, postupnou ztrátou aktivity alkalické fosfatázy lze snížit fixaci a skladováním v mrazničce přes noc.⁵ Filmy je třeba vysušit alespoň 1 hodinu před fixací a 3 hodiny po fixaci před zmrazením.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

ACETON, ACS reagencie
FORMALDEHYD, 37 % ACS

POZNÁMKY:

Při provádění procedury používejte kontrolní sklíčka. Ty lze získat od pacientů s hnisavou leukocytózou, od žen ve třetím trimestru těhotenství nebo v několika poporodních dnech. Bodování alkalické fosfatázy leukocytů těchto osob dosahuje obvykle 100. Negativní kontrolu lze připravit z normálních fixovaných nátěrů ponořením do vroucí vody, aby se inaktivoval enzym. Kontrolní filmy lze uchovávat až 1 rok za podmínek, že jsou fixovány, zalaty v parafínu a skladovány při -70 °C. Filmy je třeba vysušit alespoň 1 hodinu před fixací a 3 hodiny po fixaci před zmrazením.

Důrazně se doporučuje, aby každá laboratorní stanovička stanovila svůj očekávaný rozsah, charakteristický pro místní populaci.

Postup závisí na subjektivním hodnocení nabarvených buněk. To může mít za následek velkou variabilitu získaných hodnocení. Teplota reakční směsi musí být udržována mezi 18-26 °C. Nižší teploty mají za následek výrazné snížení bodování. Při teplotě nad 30 °C lze pozorovat výrazný nárůst aktivity. Eosinofily se nebarví, ale lze je rozpoznat bilobovanými jádry a velkými lomivými zrny.

Co se týče údajů o sloučeninách, které mohou interferovat s aktivitou alkalické fosfatázy leukocytů (LAPA), neexistuje dostatek údajů. O některých léčících a substancích je známo, že mají vliv na aktivitu alkalické fosfatázy.⁶ Orální antikoncepční prostředky, kortizol a stres mohou snižovat bodování alkalické fosfatázy leukocytů.³

U lidí je aktivita alkalické fosfatázy omezena na zralé a pásy tvořící granulocyty. Občas lze pozorovat slabé zbarvení v lymfocytech. Osteoblasty kostní dřené a endoteliální buňky se zbarvují silně. V mnoha myelomech lze pozorovat výrazné zvýšení alkalické fosfatázy leukocytů v periferní krvi. Hodgkinově nemoci, polycytemia vera a infekční leukocytózy. Nízká nebo žádná aktivita byla pozorována v chronické myelocytické leukémii, dědičné hypofosfatáze a paroxysmální nekturnální hemoglobinurie.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP

POZNÁMKA: Použijete-li nádoby Columbia, podělte množství reagencí 5.

1. Odměřte 48 mL deionizované vody a nastavte teplotu na 18-26 °C.
2. Připravte roztok diazoniové sole:
Přidejte 1 mL roztoku nitridu sodného do 1 mL alkalického roztoku FRV
NEBO

- Přidejte 1 mL roztoku nitridu sodného do 1 mL alkalického roztoku FBB.
Převracením opatrně promíchejte. Nechejte ustát 2 minuty.
- Přidejte roztok připravený v kroku 2 do deionizované vody z kroku 1.
 - Přidejte 1 mL alkalického roztoku naftolu AS-BI do zředěného roztoku diazoniové sole (krok 3). Opatrně promíchejte a vlijte do nádoby Coplin.
 - Vyrovnejte teplotu fixačního roztoku citráto-acetonového formaldehydu na pokojovou teplotu (18-26 °C). Fixujte sklíčka ponořením do fixačního roztoku na dobu 30 sekund. Opatrně propláchněte v deionizované vodě na 45 sekund. Nenechte sklíčka vyschnout.
 - Přeneste sklíčka do směsi alkalického barviva (krok 4) a inkubujte při 18-26 °C na 15 minut. Chraňte ponořená sklíčka před světlem. Po použití směs alkalického barviva zlikvidujte.
 - Po 15 minutové inkubaci sklíčka vyjměte z nádoby Coplin a proplachujte je 2 minuty v deionizované vodě. Nenechte sklíčka vyschnout.
 - Provedte kontrastní barvení po dobu 2 minut. Při použití alkalického roztoku FRV, zvolte kontrastní barvivo hematoxylinový roztok, Gill č. 3. Jestliže používáte alkalický roztok FBB, barvěte kontrastním barvivem neutrální pufovaný roztok červeně.
 - Propláchněte sklíčka důkladně ve vodovodní vodě a nechejte uschnout na vzduchu.
 - Mikroskopicky vyhodnoťte. Je-li potřeba sklíčka zakrýt, použijte pouze vodné montážní médium.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

BODOVACÍ METODA:

Pečlivě prohlédněte film (900X) a vyberte tenkou vrstvu, kde jsou erythrocyty zachyceny velmi málo. Oblasti aktivity fosfatázy se zobrazí jako modrá nebo červená zrnka, v závislosti na použitém barvivu. Vyberte 100 nepřetržitě segmentovaných a pásy tvořících neutrofilních granulocytů. Vyhodnoťte stupnicí od 0 do 4+ na základě množství a intenzity vysráženého barviva uvnitř cytoplazmy těchto buněk. Charakteristiky bodování naleznete v tabulce 1. Suma hodnocení 100 buněk je pokládána za skóre.

TABULKA 1. PARAMETRY BODOVÁNÍ*

Vysrážené azobarvivo v cytoplasmě				
Hodnocení buněk	Množství** (%)	Velikost granulí	Intenzita zabarvení	Pozadí cytoplazmy
0+	Žádné	—	Žádné	Žádné
1+	50	Malé	Nejasné až Střední	Méně zabarvené až slabě růžové ne modré
2+	50-80	Malé	Střední až silné	Méně zabarvené až slabě růžové nebo modré
3+	80-100	Střední až velké	Silné	Méně zabarvené až růžové nebo modré
4+	100	Střední až velké	Velmi silné	Neviditelné

* Tabulka 1 představuje modifikaci pozorování uskutečněnou Kaplowem.^{2,3}

** Procentuelní množství cytoplazmy obsazené vysrážením azobarvivem.

K zjištěnému skóre aktivity alkalické fosfatázy (LAPA) v leukocytech je třeba počet spočtených buněk násobit hodnotou hodnocení buněk. Výpočty jsou přidány k zjištění skóre LAPA, jak je uvedeno v následujících případech:

Hodnocení buněk	Vypočteno	LAPA Skóre
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Celkem	100	67

Následující skóre byla zjištěna společností Sigma-Aldrich pro 40 zdravých jedinců popsanou metodou.

	Fast Red Violet LB	Fast Blue BB
Průměrná LAPA ± 1 SD	76±31	94±39
Rozsah LAPA	44-106	55-133

Rozsah normálního skóre je velmi široký, kolísá od 20 do 180. Následující rozsah skóre byl získán od těchto 40 zdravých jedinců:

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

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122
nebo e-mailujte na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

- 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
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, Park Ridge (NJ), 1982, pp 248-250
- Burstone MS: IN Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms. Academic Press, New York, 1962, pp 88-113
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, No. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed. DS Young, Editors, AACCPress, Washington (DC), 1990
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

Parafilm je registrovanou ochrannou známkou společnosti American Can Company, Greenwich, CT

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. 86
Předchozí revize: 2003-02
Revidováno: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Egyesült Királyság