

## FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Sigma-Aldrich Alkaline Phosphatase készletek leukocitákban előforduló lúgos foszfatáz aktivitás hisztokémiai szemikvantitatív bemutatására javalltak. Az Alkaline Phosphatase reagensek in vitro diagnosztikai használatra javallottak.

A hematopoiitikus szövetben a lúgos foszfatáz korlátozottan jelenik meg a sávos és szegmentált neutrofilekben.<sup>1-2</sup> Párhuzamos elfogással történő bemutatása szubsztituált naftolt és diazónium sókat használva talán a citokémiai enzim vizsgálatok legkorábbi példája, melynek klinikai jelentősége is van.<sup>3</sup>

A legtöbb eljárás, a Sigma-Aldrich félt is beleértve, stabil diazónium sókat alkalmaz. Ezek aril-amin nátrium-nitrítrel való reakciója során képződnek savas közegben.<sup>4</sup> A kapott diazónium-klorid (általában instabil) ezután olyan vegyületekkel kezelhető, mint például a cink-klorid, a cink-szulfát vagy a naftalin-1,6-diszulfonát, melyekkel stabil sókat alkot. Ezek a stabilizátorok észrevehetően gátolnak néhány enzimátikus rendszert, mivel a diazónium-kloridok kevésbé tiltók.<sup>4</sup> Ezért a Sigma-Aldrich fast red violet LB, fast blue BB alapú és nátrium-nitrítés stabil oldatokat biztosít a lúgos foszfatáz citokémiához. A módszerek további egyszerűsítéséhez, használható a naftol-AS-BI-foszfat stabil oldata is.

A vizsgálat elvégzéséhez, a fixált vér hátyákat szobahőmérsékleten (18-26 °C), naftol-AS-BI-foszfatot és frissen készített, pH=9,5-ön 2-amino-2-metil-1,3-propándiollal (AMPD) pufferelt fast red violet LB sötét vagy fast blue BB sötét tartalmazó oldatban inkubálják. Az aktivitási helyek vagy vörösek vagy kékek a diazónium-sótól függően. A fast red violet LB-s eljárás hasonló a javasolt NCCLS referencia módszerhez.<sup>5</sup>

## REAGENSEK

**NAPHTHOL AS-BI ALKALINE SOLUTION**, Katalógus szám: 86-1  
Naftol-AS-BI-foszfat. 4 mg/ml, AMPD pufferben, 2 mol/l, pH=9,5.

**FRV-ALKALINE SOLUTION**, Katalógus szám: 86-2  
Fast red violet LB alap, 5 mg/ml, sósavban, 0,4 mol/l, stabilizátorral.

**FBB-ALKALINE SOLUTION**, Katalógus szám: 86-3  
Fast blue BB alap, 5 mg/ml, sósavban, 0,4 mol/l, stabilizátorral.

**SODIUM NITRITE SOLUTION**, Katalógus szám: 91-4  
Nátrium-nitrít, 0,1 mol/l.

**CITRATE SOLUTION**, Katalógus szám: 91-5  
Citromsav, 18 mmol/l, nátrium-citrát, 9 mmol/l, nátrium-klorid, 12 mmol/l, felületkezelő anyaggal. pH=3,6-on pufferelve.

**HEMATOXYLIN SOLUTION, GILL NO. 3**, Katalógus szám: GHS-3  
Igazolt hematoxilin, 6,0 g/l, nátrium-jodát, 0,6 g/l, alumínium-szulfát, 52,8 g/l és stabilizátorok.

**NEUTRAL RED SOLUTION, BUFFERED**, Katalógus szám: N 6264  
Semleges vörös, igazolt, 0,5 % w/v, acetát pufferben, pH=5,2. Tartósítószerrel.

### TÁROLÁSI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ELTARTHATÓSÁG:

A Naphthol AS-BI Alkaline Solution, az FRV-Alkaline Solution, az FBB-Alkaline Solution és a Sodium Nitrite Solution hűtőszekrényben (2-8 °C) tárolandó. A reagensek a lejárat dátumig használhatók fel.

A Citrate Solution hűtőszekrényben tárolandó (2-8 °C). Az oldat megfelelően használható a mikrobás növekedés hiányakor.

A Hematoxylin Solution és a Neutral Red Solution szobahőmérsékleten tárolandó (18-26 °C). A Hematoxylin Solution-t fénytől védjék. A reagensek a lejárat dátumig használhatók fel.

### TÖNKREMENTEL:

Ha a Hematoxylin Solution barna (levegőn oxidálódott) vagy bíborszínű (elvesztette a savasságát), meg kell semmisíteni.

### ELŐKÉSZÍTÉS:

A reagensek használatra készek.

**CITRATE-ACETONE-FORMALDEHYDE FIXATIVE:** 25 ml Citrate Solution-hoz, Katalógus szám: 91-5, adjanak 65 ml acetont és 8 ml 37 %-os formaldehidet. Helyezzék üveg palackba és szorosan zárják le kupakkal. Hűtőszekrényben (2-8 °C) tárolandó. Használat előtt 18-26 °C-ra melegítendő. Maximum 4 hétig stabil, ha szorosan lezárva hűtőszekrényben tárolják.

### ÖVINTÉZKEDÉSEK:

A laboratóriumi reagensekkel történő munka során a szokásos övintézkedéseket be kell tartani. Hulladék-megsemmisítés az összes helyi, állami, tartományi vagy nemzeti szabály figyelembevételével. A legfrissebb kockázati, veszély vagy biztonsági információkat lásd az Anyagbiztonsági adatlapban.

### US Kockázati és biztonsági mondatok

Naphthol AS-BI Alkaline Solution és Neutral Red Solution. Figyelem: Az anyagot még nem teljesen vizsgálták.

Az FRV-Alkaline Solution MARÓ. Lenyelve ártalmas. Belélegezve mérgező (toxikus). Égési sérülést okoz. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullet esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni. Céliszervek: Máj és vesék.

Az FBB-Alkaline Solution MÉRGEZŐ. Belélegezve mérgező (toxikus). Égési sérülést okoz. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullet esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni. Céliszervek: Máj és vesék.

A Gill féle 3 hematoxilin oldat ÁRTALMAS. Lenyelve ártalmas. Szem- és bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni. Céliszervek: Máj és vesék.

Az acetone GYŰLÉKONY és IRRITATÍV. Szemizgató hatású. Ismételt expozíció a bőr kiszáradását vagy megrepedezését okozhatja. Gőzök álmosságot vagy szédülést okozhatnak. Az edényzet jól szellőztethető helyen tartandó. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Céliszervek: Máj és vesék.

A formaldehid oldat MÉRGEZŐ (TOXIKUS). Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve mérgező (toxikus). Égési sérülést okoz. Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet). Bőrrel érintkezve érzékenységet okozhat. Örökítő genetikai károsodást okozhat (mutagén hatású lehet)! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullet esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni. Jól szellőző helyen tartandó.

Az Európai Unió kockázati és biztonsági mondatai

Naphthol AS-BI Alkaline Solution és Neutral Red Solution. Figyelem: Az anyagot még nem teljesen vizsgálták.

Az FRV-Alkaline Solution és a FBB-Alkaline Solution ÁRTALMASAK. Lenyelve ártalmas. Megfelelő védőöltözetet kell viselni.

A Gill féle 3 hematoxilin oldat ÁRTALMAS. Lenyelve ártalmas. Szem- és bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt kell viselni.

Az acetone RENDKÍVÜL GYŰLÉKONY és IRRITATÍV. Rendkívül gyúlékony. Szemizgató hatású. Ismételt expozíció a bőr kiszáradását vagy megrepedezését okozhatja. Gőzök álmosságot vagy szédülést okozhatnak. Az edényzet jól szellőztethető helyen tartandó. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni.

A formaldehid oldat MÉRGEZŐ (TOXIKUS). Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve mérgező (toxikus). Égési sérülést okoz. Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet). Bőrrel érintkezve érzékenységet okozhat. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullet esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni. Jól szellőző helyen tartandó.

## ELJÁRÁS

### MINTA BEGYŰJTÉSE:

Javasolt a minta begyűjtését az M29-A2 NCCLS dokumentum szerint végezni. Semmiféle vizsgálati módszer nem ismert, mely teljes bizonyossággal kimutathatja, hogy a vérminták vagy a szövet nem terjeszt fertőzést. Ezért, minden vér származék vagy szövetminta esetlegesen fertőzőnek tekintendő.

Friss vér vagy csontvelő hátyák vagy heparinnal antikoagulált minták használhatók.<sup>5</sup> Az EDTA kerülendő.<sup>5</sup> A vérkeneteket az enzim aktivitáshoz az elkészítés után 8 órán belül festeni kell. Azonban, ha ez nem lehetséges, a lúgos foszfatáz aktivitás fokozatos csökkenése késleltethető az egész éjszakán át tartó fagyasztóban történő fixálással és tárolással.<sup>5</sup> A hátyákat a fixálás előtt legalább 1 órával szárítani kell és a fixálás után 3 órával a fagyasztás előtt.

### SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT SPECIÁLIS ANYAGOK:

Aceton, ACS reagens  
FORMALDEHYDE, 37 % ACS

### MEGJEGYZÉSEK:

Az eljárás során használjanak pozitív kontrollokat. Ezeket olyan betegektől szerezhetik be, akik gennykeltő leukocitózisban szenvednek, illetve harmadik trimeszterben lévő terhes nőktől vagy a gyermekágy első néhány napjában lévő nőktől. Ezeknél az embereknél a leukocita lúgos foszfatáz értékek általában meghaladják a 100-at. Negatív kontroll készíthető a normál, fixált kenetből, ha 1 percre forró vízbe mártják az enzim inaktiválása miatt. A kontroll hátyák megőrizhetők maximum 1 évig, ha fixálva, Parafilm®-mel takarva -70 °C-on tárolják. Ezeket a hátyákat a fixálás előtt legalább 1 órával levegőn szárítani kell és a fixálás után 3 órával a fagyasztás előtt.

Nagyon javasolt mindegyik laboratóriumnak, hogy megállapítsák a saját várt tartományt, mely a helyi népeiségre jellemző.

Az eljárás a festett sejtek szubjektív értékelésétől függ. Emiatt sokféle értékelést kaphatnak. A reakciókeverék hőmérsékletét 18-26 °C között kell tartani. Alacsonyabb hőmérséklet esetén jelentősen alacsonyabb értékeket kapnak. 30 °C felett, az aktivitás észrevehető növekedése tapasztalható. Az eozinofilek nem festenek, de a kétlebenyű magokkal és a nagy törekeny granulátumokkal azonosíthatók.

Hiányosak azok, a vegyületekre vonatkozó adatok, melyek akadályozhatják a leukocita lúgos foszfatáz aktivitást (LAPA) Bizonyos gyógyszerekről és más anyagokról ismert, hogy befolyásolják a lúgos foszfatáz aktivitás keringését.<sup>6</sup> Az orális fogamzásgátlók, a kortizol és a stressz megnövekedett leukocita lúgos foszfatáz értékeket eredményezhetnek.<sup>3</sup>

Az emberek esetén, a lúgos foszfatáz aktivitás az érett és sáv-formájú granulocitákra korlátozódik. Néha gyenge festés tapasztalható a limfocitákban. A csontvelő oszteoblastok és az endoteliális sejtek erősen festenek. Észrevehető növekedés figyelhető meg a perifériás vér leukocita lúgos foszfatázban többszörös mielóma, Hodgkin-kór, policitémiás vera és fertőző leukocitózis esetén. Alacsony vagy hiányos aktivitás látható krónikus mielocitikus leukémia, örökletes hipofoszfatázia és rohamokban fellépő noncturnális hemoglobinúria esetén.

Az ilyen eljárásból kapott adatok csak segítségként szolgálnak a diagnózishoz és egyéb klinikai diagnosztikai vizsgálatokkal vagy információkkal együtt át kell vizsgálni.

## ELJÁRÁS

MEGJEGYZÉS: Columbia edénnyel való használathoz, osszák el a reagensek térfogatait 5-tel.

- Mérjenek ki 45 ml ioncserélt vizet és állítsák be a hőmérsékletet 18-26 °C-ra.
- Készítsenek diazónium só oldatot:  
Adjanak 1 ml Sodium Nitrite Solution-t 1 ml FRV-Alkaline Solution-hoz.  
vagy  
Adjanak 1 ml Sodium Nitrite Solution-t 1 ml FBB-Alkaline Solution-hoz.  
Keverjék össze óvatosan megfordítgatva. Hagyják állni 2 percig.
- A 2. lépésben elkészített oldatot adják hozzá az 1. lépés ioncserélt vizéhez.
- Adjanak 1 ml Naphthol AS-BI Alkaline Solution-t a hígított diazónium só oldathoz (3. lépés). Alaposan keverjék össze és öntsék egy Coplin edénybe.
- A Citrate-Acetone-Formaldehyde Fixative Solution legyen szobahőmérsékletű (18-26 °C). Fixálják a tárgylemezeket 30 másodpercre belemerítve a fixáló oldatba. Óvatosan öblítsék ioncserélt vízben 45 másodpercig. Ne hagyják a tárgylemezeket megszáradni.
- Tegyék a tárgylemezeket lúg-festék keverékbe (4. lépés) és inkubálják 18-26 °C-on 15 percig. A merített tárgylemezeket védjék a közvetlen napfénytől. Használat után a lúg-festék keverék megsemmisítendő.
- 15 perc inkubálás után, vegyék ki a tárgylemezeket a Coplin edényből és öblítsék 2 percig ioncserélt vízben. Ne hagyják a tárgylemezeket megszáradni.
- Fessék után 2 percig. Ha FRV-Alkaline Solution-t használnak, fessék után Hematoxylin Solution, Gill No. 3-mal. Ha FBB-Alkaline Solution-t használnak, fessék után Neutral Red Solution-nal, Buffered.
- Öblítsék le a tárgylemezeket alaposan csapvízben és levegőn szárítsák meg.
- Értékeljék mikroszkópiusan. Ha fedőlemezekre van szükség, használjanak vizes fedő médiumot.

## TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

### ÉRTÉKELÉSI MÓD:

Tanulmányozzák a hárttyát (900X) és válasszanak egy vékony területet, ahol az eritrociták éppencsak érintkeznek. A foszfatáz aktivitás helyei kék vagy vörös granulátumokként jelennek meg a használt festéktől függően. Válasszanak 100 egymást követő szegmentált és sávos neutrofil granulocitát. Oszályozzák 0-4+ között a sejtek citoplazmáin belül kicsapott festék mennyisége és intenzitása alapján. Az értékelés jellemzői az 1. táblázatban találhatóak. A 100 sejt értékelésének összege a pont.

### 1. TÁBLÁZAT: AZ ÉRTÉKELÉS JELLEMZŐI\*

A citoplazmában kicsapott azo-festék				
Sejt Oszályozás	Összeg** (%)	Szemcseméret	Intenzitás Festés	Háttér Citoplazma
0+	Semmi	—	Semmi	Semmi
1+	50	Kicsi	Halvány Közepes	Színtelen nagyon halvány rózsaszín vagy kék
2+	50-80	Kicsi	Közepes erős	Színtelen-halvány rózsaszín vagy kék
3+	80-100	Közepes-nagy	Erős	Színtelen-rózsaszín vagy kék
4+	100	közepes és nagy	Fényes	Nem látható

\* Az 1. táblázat bemutatja a Kaplow által végzett megfigyelések módosítását.<sup>2,3</sup>

\*\* Az azo-festék csapadék által elfoglalt citoplazma térfogata százalékban.

A leukocita lúgos foszfatáz aktivitás (LAPA) értékhez, a számolt sejtek számát meg kell szorozni a sejt minősítés értékével. Ezeket a számjegyeket adják hozzá a LAPA érték megkapásához, ahogyan a következő példákban is látható.

Sejt Minősítés	Számolt Pont	LAPA Pont
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Összesen	100	67

A leírt módszerrel a Sigma-Aldrich a következő pontokat kapta 40 egészséges ember esetén.

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765

Műszaki szolgálat: 800-325-0250 vagy hívják 314-771-3122

vagy e-mail: clintech@sial.com

Megrendelés: 800-325-3010 vagy hívják: 314-771-5750

www.sigma-aldrich.com

Fast Red Violet LB

Fast Blue BB

LAPA Átlag ± 1 SD

76±31

94±39

LAPA tartomány

44-106

55-133

A normál pontok tartománya széles, 20 és 180 között változik. A következő ponttartományokat kapták 40 normál személy esetében:

Fast Red Violet LB

20-146

Fast Blue BB

25-180

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várttól, vegyék fel a kapcsolatot a Sigma Aldrich műszaki szolgálatával.

## IRODALOMJEGYZÉK

- 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, AACC Press, Washington (DC), 1990
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann New York Acad Sci 155:911, 1968

A Parafilm az American Can Company, Greenwich, CT bejegyzett védjegye.

Sigma-Aldrich, Inc. garantálja, hogy termékei megfelelnek a jelen és egyéb Sigma-Aldrich publikációkban közölt információkkal. A vevő köteles a termék(ek) megfelelőségét az adott felhasználáshoz meghatározni. További kikötések és feltételek alkalmazhatók. Lásd a számla vagy csomagolás hátsó oldalát a további eladási kikötések és feltételek tekintetében.

Eljárás száma: 86  
Korábbi felülvizsgálás: 2003-02  
Felülvizsgálva: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Velká Británie