

Instructions for Use

Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit

Procedure No. 85



Intended Use

Sigma-Aldrich Alkaline Phosphatase kits are intended as a general laboratory use histological stain. Alkaline Phosphatase reagents are for professional "In Vitro Diagnostic Use" only. This manual, qualitative, histochemical procedure demonstrates alkaline phosphatase activity in leukocytes of human blood or bone marrow films. Histological visualization of leukocyte associated alkaline phosphatase is a unique technique currently commonly used in medicine.

In 1929, Kay first suggested the presence of alkaline phosphatase in leukocytes.¹ However, not until many years later did Kaplow introduce a practical staining method for demonstrating the leukocyte enzyme.² Kaplow used sodium α -naphthyl phosphate as substrate, fast blue RR as the diazonium salt and recommended a scoring method for semiquantitative comparisons.³ Also suggested were improvements resulting in good preservation of cellular morphology. Subsequently, α -naphthyl phosphate was replaced by naphthol AS phosphate. It is noteworthy that a good correlation has been found between cytochemical and biochemical techniques for assaying leukocyte alkaline phosphatase activity (LAPA).³

With the Sigma-Aldrich method, leukocyte alkaline phosphatase is determined in blood or bone marrow films after they are gently fixed to slides. The fixed films are then incubated in a solution containing naphthol AS-MX phosphate. As a result of phosphatase activity, naphthol AS-MX is liberated and immediately coupled with a diazonium salt, forming an insoluble, visible pigment at sites of phosphatase activity.

Reagents

Fast Blue RR Salt (Cat. No. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, Preweighed capsules. Actual weight per capsule will vary with dye lot and has been optimized by assay.

Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution (Cat. No. 855-20ML)

Naphthol AS-MX phosphate, 0.25% (w/v), buffered at pH 8.6, 25°C. Danger. Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. May cause respiratory irritation. Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray. IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

Mayer's Hematoxylin Solution (Cat. No. MHS1-100ML)

Hematoxylin, certified, 1 g/L, C.I. 75290, sodium iodate, 0.2 g/L, aluminum ammonium hydroxide, 5 g/L, and stabilizers

Citrate Concentrated Solution (Cat. No. 854C-20ML)

Citric acid-sodium citrate, 1.5 mol/L. Danger. Causes skin irritation. Causes serious eye damage. Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray. May cause respiratory irritation. Wear protective gloves/eye protection/face protection.

Special Materials Required but Not Provided

- Scott's tap water substitute concentrate, Catalog No. S5134
- Acetone, ACS reagent

Storage and Stability

Store Fast Blue RR Salt below 0°C. Store Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution in refrigerator (2–8°C). Reagents are stable until expiration date.

Store Mayer's Hematoxylin Solution tightly capped at room temperature (18–26°C) protected from light. Do not return solution to original container after use in Coplin jar. Discard when the time required for suitable staining exceeds the time recommended in the procedure by more than 5 minutes.

Store Citrate Concentrated Solution at room temperature (18–26°C). Store Citrate Working Solution in refrigerator (2–8°C). Citrate solutions are suitable for use in the absence of microbial growth.

Preparation

Fast Blue RR Salt, Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution and Mayer's Hematoxylin Solution are provided ready for use in the procedure.

Prepare Citrate Working Solution by diluting 2 mL Citrate Concentrate Solution to 100 mL with deionized water.

To prepare Fixative Solution (citrate buffered acetone, 60%), warm Citrate Working Solution to room temperature (18–26°C). With constant stirring, add 2 volumes of Citrate Working Solution to 3 volumes of acetone. Discard after use.

Scott's Tap Water Substitute Working solution is prepared by diluting 1 volume of Scott's Tap Water Substitute Concentrate with 9 volumes deionized water.

Precautions

These IVD's are intended for in vitro diagnostic use in a clinical laboratory environment. These IVDs are for professional use by qualified personnel only. Sigma-Aldrich IVDs may be operated by laboratory personnel who are trained to handle human specimens that can be infectious, use microscopes and other laboratory equipment and have color perception and visual acuity to distinguish colors and other objects under a microscope.

Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. Dispose of waste observing all local, state, provincial or national regulations.

Procedure

Specimen Collection

Fresh blood or bone marrow films or samples anticoagulated with heparin may be used.⁴ AVOID EDTA.⁴ Blood smears should be stained for enzyme activity within 8 hours after preparation. However, if this is not possible, gradual loss of alkaline phosphatase activity may be delayed by fixation and storage overnight in freezer.⁴ Films should be dried at least 1 hour prior to fixation and 3 hours post-fixation before freezing.

Notes

There is a scarcity of data concerning compounds which may interfere with leukocyte alkaline phosphatase activity (LAPA). Certain drugs and other substances are known to influence circulating alkaline phosphatase activity.⁵ Oral contraceptives, cortisol and stress may result in elevated leukocyte alkaline phosphatase scores.⁶

Perform procedure using positive controls. These can be obtained from patients with pyogenic leukocytosis, or women in the third trimester of pregnancy or during the first several days postpartum. Leukocyte alkaline phosphatase scores from these persons usually exceed 100. A negative control can be prepared from a normal fixed smear by immersing it in boiling water for 1 minute to inactivate the enzyme. Control films can be preserved up to 1 year if stored fixed, wrapped in Parafilm® at –70°C. These films should be air dried at least 1 hour prior to fixation and 3 hours post-fixation before freezing.

It is strongly recommended that each laboratory establish its own expected range, characteristic for the local population.

The procedure depends upon subjective rating of stained cells. This can result in a wide variation of ratings obtained. The temperature of the reaction mixture must be kept between 18–26°C. Lower temperatures will result in significantly lower scores. Above 30°C, marked increases in activity will occur. Eosinophils do not stain but can be recognized by bilobate nuclei and large refractile granules.

Procedure

1. Measure 48 mL distilled water into a suitable container and adjust temperature to 18–26°C.
2. Prepare diazonium salt solution:
Dissolve contents of one Fast Blue RR Salt capsule in distilled water (from Step 1). A magnetic stirrer may be helpful.
3. Add 2 mL Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution to diluted diazonium salt solution (from Step 2). Mix.
4. Bring Fixative Solution to room temperature (18–26°C). Fix slides by immersing in Fixative Solution for 30 seconds. Rinse gently in deionized water for 45 seconds. Do not allow slides to dry.
5. Add slides to alkaline-dye mixture (from Step 3) and incubate at 18–26°C for 30 minutes. Protect immersed slides from direct light. Discard alkaline-dye mixture after use.
6. After 30 minutes, remove slides and rinse thoroughly in deionized water for 2 minutes. Do not allow slides to dry.
7. Place slides in Mayer's Hematoxylin Solution for 10 minutes.
8. Rinse counterstained slides for 3 minutes in deionized water. This will result in red violet nuclear staining.
9. Evaluate microscopically. If coverslipping is required use only an aqueous mounting media.

Performance Characteristics

Method of Scoring

Scan the film (900X) and select a thin area where erythrocytes are barely touching. Sites of phosphatase activity will appear as blue granules. Select 100 consecutive segmented and band form neutrophilic granulocytes. Rate from 0 to 4+ on the basis of quantity and intensity of precipitated dye within the cytoplasm of these cells. For characteristics of scoring, refer to Table 1. The sum of the ratings of 100 cells is regarded as the score.

Table 1. Characteristics of Scoring*

Cell Rating	Precipitated Azo Dye in Cytoplasm			Background of Cytoplasm
	Amount** (%)	Granule Size	Staining Intensity	
0+	None	-	None	None
1+	50	Small	Faint to Moderate	Colorless to very pale blue
2+	50-80	Small	Moderate to Strong	Colorless to pale blue
3+	80-100	Medium to Large	Strong	Colorless to blue
4+	100	Medium to Large	Brilliant	Not visible

* Table 1 represents modification of observations made by Kaplow.^{2,3}

** Percentage of volume of cytoplasm occupied by azo dye precipitate.

To obtain the leukocyte alkaline phosphatase activity (LAPA) score, the number of cells counted is multiplied by the value for cell rating. These figures are added to obtain the LAPA score as shown in the following examples:

Cell Rating	Counted Score	LAPA Score
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

Expected Values

The following scores were obtained at Sigma-Aldrich for 20 normal individuals. Blood was drawn into heparinized tubes and films were prepared within one hour.

Fast Blue RR	
LAPA Mean $\pm$ 1SD	96 $\pm$ 44
LAPA Range	52-140

The following range of scores were obtained from those 20 normal individuals:

Fast Blue RR	
	32-182

If observed results vary from expected results, please contact Sigma-Aldrich Technical Service for assistance.

Expected Observations

In humans, alkaline phosphatase activity is restricted to mature and band-form granulocytes. Occasionally weak staining may be observed in lymphocytes. Bone marrow osteoblasts and endothelial cells stain strongly.

A series of slides was prepared using blood obtained from normal subjects, females in the last trimester of pregnancy, early postpartum patients, and individuals exhibiting a leukemoid reaction. Negative controls were prepared by heat inactivation as described. Various combinations of Fast Blue RR and counterstains (Methylene Blue Solution and Mayer's Hematoxylin Solution) were performed in replicate and the LAPA scored. Values obtained on multiple slides prepared on each subject were in close agreement and did not appear influenced by the staining/counterstaining technique employed. For example, 7 smears made using blood from a prenatal patient yielded scores ranging from 235–269 with a mean, standard deviation and coefficient of variation of 255, 11.3 and 4.4% respectively. Negative controls revealed a complete absence of stained material.

Analytical Performance Characteristics

The analytical performance results for the given tests conducted on all target structures, confirm 100% sensitivity, specificity, and repeatability.

Cat. No	Product Description	Target	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity
FBS25	Fast Blue RR Salt	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
855	Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
MHS1	Mayer's Hematoxylin Solution	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
854C	Citrate Concentrated Solution	Sites of Activity	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3

Warnings and Hazards

Refer to Safety Data Sheet and product labeling for any updated risk, hazard or safety information.

85L1:



- H290 May be corrosive to metals.
- H331 Toxic if inhaled.
- P234 Keep only in original packaging.
- P261 Avoid breathing mist or vapors.
- P271 Use only outdoors or in a well-ventilated area.
- P304 + P340 + P311 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER/ doctor.
- P390 Absorb spillage to prevent material damage.
- P403 + P233 Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.

85L2:



- H290 May be corrosive to metals.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H331 Toxic if inhaled.
- P234 Keep only in original packaging.
- P261 Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapors/ spray.
- P264 Wash skin thoroughly after handling.
- P271 Use only outdoors or in a well-ventilated area.
- P304 + P340 + P311 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER/ doctor.
- P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

If during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

Symbol Definitions

Symbols as defined in EN ISO 15223-1:2021

	Manufacturer		Catalogue Number
	Consult Instructions for Use		Batch Code
	Authorized Representative in the European Community/ European Union		European Union Declaration of Conformity (defined in IVDR 2017/746)
	Use-by Date		In vitro diagnostic medical device
	Temperature Limit		Caution
	Date of Manufacture		Importer
	Indicates the Authorised Representative in Switzerland		

References

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Contact Information

To place an order, please visit our web site at [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). For Technical Service, please visit the tech service page on our web site at [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revision History

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023
Transferred to new template with current branding. Specified for professional use in intended use and precautions. Revised intended use to align with IVDR guidelines. Updated Material Safety Data Sheet to Safety Data Sheet. Updated contact information. Removed instruction to follow CLSI for specimen collection. Removed EN 980 and changed to EN ISO 15223-1:2021 for symbols. Added adverse event contact information. Removed reference #4 and renumbered the references. Added a revision history table. Added additional danger statement for 854C-20ML and 855-20ML. Added Warnings and Hazards. Added CH-REP information.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

The Initial M and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Anweisungen für den Gebrauch

Alkalische Phosphatase, Leukozyten – Kit

Verfahren Nr. 85



Verwendungszweck

Die alkalische Phosphatase-Kits von Sigma-Aldrich sind als allgemeine histologische Färbemittel für den Laborgebrauch bestimmt. Die Reagenzien für die alkalische Phosphatase sind für die professionelle „In-vitro-Diagnostik“ bestimmt. Dieses manuelle, qualitative, histochemische Verfahren weist die Aktivität von alkalischer Phosphatase in Leukozyten aus menschlichem Blut oder Knochenmarkausstrichen nach. Die histologische Visualisierung der Leukozyten-assoziierten alkalischen Phosphatase ist eine einzigartige Technik, die derzeit in der Medizin häufig eingesetzt wird.

1929 verwies Kay erstmals auf das Vorhandensein von alkalischer Phosphatase in Leukozyten.¹ Allerdings entwickelte erst Kaplow viele Jahre später eine geeignete Färbemethode für den Nachweis des Leukozytenenzym.² Kaplow verwendete Natrium- α -Naphthylphosphat als Substrat, Echtblau RR als Diazoniumsalz und empfahl eine Bewertungsmethode für den semiquantitativen Vergleich.² Ferner wurden Verbesserungen empfohlen, mit denen die Zellmorphologie weitgehend erhalten bleibt. Später wurde α -Naphthylphosphat durch Naphthol-AS-Phosphat ersetzt. Besonders hervorzuheben ist, dass bei der Bestimmung der leukozytären alkalischen Phosphataktivität (LAPA) eine gute Korrelation zwischen den zytochemischen und biochemischen Techniken festgestellt werden konnte.³

Bei der Methode von Sigma-Aldrich wird die alkalische Phosphatase von Leukozyten in Blut- oder Knochenmarkausstrichen bestimmt, nachdem diese vorsichtig auf Objektträgern fixiert wurden. Die fixierten Ausstriche werden dann in einer Lösung mit Naphthol-AS-MX-Phosphat inkubiert. In Folge der Phosphataseaktivität wird das Naphthol-AS-MX freigesetzt, welches sofort eine Verbindung mit einem Diazoniumsalz eingeht. Dadurch entsteht in den Bereichen der Phosphataseaktivität ein unlösliches, gut sichtbares Pigment.

Reagenzien

Echtblausalz RR (Kat.-Nr. FBS25-10CAP)

Echtblau, C.I. 37155, abgewogene Kapseln. Das tatsächliche Gewicht pro Kapsel hängt von der Farbstoffcharge ab und wurde anhand von Assays optimiert.

Alkalische Naphthol-AS-MX-Phosphatlösung (Kat.-Nr. 855-20ML)

Naphthol-AS-MX Phosphat, 0,25 % (w/v), gepuffert bei pH-Wert 8,6, 25 °C. Gefahr: Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizungen. Kann die Atemwege reizen. Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfe/Spray möglichst nicht einatmen. BEI VERSCHLUCKEN: Rufen Sie sofort eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.

Mayer-Hämatoxylin-Lösung (Kat.-Nr. MHS1-100ML)

Hämatoxylin, zertifiziert, 1 g/l, C.I. 75290, Natriumiodat, 0,2 g/l, Aluminiumammoniumhydroxid, 5 g/l, und Stabilisatoren

Konzentrierte Citratlösung (Kat.-Nr. 854C-20ML)

Zitronensäure-Natriumcitrat, 1,5 mol/l. Gefahr: Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfe/Spray möglichst nicht einatmen. Kann die Atemwege reizen. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

Spezielle Materialien, die erforderlich sind, aber nicht zur Verfügung gestellt werden

- Scott's Leitungswasser-Ersatzkonzentrat, Kat.-Nr. S5134
- Aceton, ACS-Reagenz

Lagerung und Stabilität

Echtblausalz RR bei Temperaturen unter 0 °C lagern. Alkalische Naphthol-AS-MX-Phosphatlösung im Kühlschrank (2–8 °C) aufbewahren. Die Reagenzien sind bis zu dem Verfallsdatum haltbar.

Mayer-Hämatoxylin-Lösung fest verschlossen bei Raumtemperatur (18–26 °C) und vor Licht geschützt lagern. Nach der Verwendung im Coplin-Färbetrog nicht in den Originalbehälter zurückgeben. Entsorgen, wenn die für eine angemessene Färbung benötigte Zeit die im Verfahren empfohlene Zeit um mehr als 5 Minuten überschreitet.

Konzentrierte Citratlösung bei Raumtemperatur (18–26 °C) lagern. Die Citrat-Arbeitslösung im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Die Citratlösungen können verwendet werden, wenn kein mikrobielles Wachstum vorhanden ist.

Vorbereitung

Echtblausalz RR, alkalische Naphthol-AS-MX-Phosphatlösung und Mayer-Hämatoxylin-Lösung werden gebrauchsfertig für das Verfahren bereitgestellt.

Die Citrat-Arbeitslösung durch Verdünnen von 2 ml konzentrierter Citratlösung mit entionisiertem Wasser auf 100 ml herstellen.

Zur Herstellung der Fixierlösung (citratgepuffertes Aceton, 60 %) die Citrat-Arbeitslösung auf Raumtemperatur (18–26 °C) erwärmen. Unter konstantem Rühren 2 Volumina der Citrat-Arbeitslösung zu 3 Volumina Aceton geben. Nach Gebrauch entsorgen.

Scott's Leitungswasser-Ersatz Arbeitslösung wird durch Verdünnen von 1 Volumen Scott's Leitungswasser-Ersatzkonzentrat mit 9 Volumina deionisiertem Wasser hergestellt.

Vorsichtsmaßnahmen

Diese IVDs sind für die In-vitro-Diagnostik in einer klinischen Laborumgebung bestimmt. Diese IVDs sind nur für den professionellen Gebrauch durch qualifiziertes Personal bestimmt. Die IVDs von Sigma-Aldrich können von Laborpersonal bedient werden, das im Umgang mit menschlichen Proben, die infektiös sein können, geschult ist, Mikroskope und andere Laborgeräte bedienen kann und über eine Farbwahrnehmung und Sehschärfe verfügt, um Farben und andere Objekte unter dem Mikroskop zu unterscheiden.

Beim Umgang mit Laborreagenzien sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Entsorgen Sie den Abfall unter Einhaltung aller örtlichen, staatlichen, regionalen oder nationalen Vorschriften.

Verfahren

Probenentnahme

Es können frische Blut- oder Knochenmarkausstriche oder mit Heparin antikoagulierte Proben verwendet werden.⁴ EDTA VERMEIDEN.⁴ Blutaussstriche sollten innerhalb von 8 Stunden nach der Zubereitung zum Nachweis der Enzymaktivität angefärbt werden. Sollte dies nicht möglich sein, kann der allmähliche Verlust der Aktivität der alkalischen Phosphatase durch Fixierung und Lagerung über Nacht im Gefrierschrank verzögert werden.⁴ Die Ausstriche sind mindestens 1 Stunde vor dem Fixieren und 3 Stunden nach dem Fixieren vor dem Einfrieren zu trocknen.

Anmerkungen

Bisher liegen nur wenige Daten über Verbindungen vor, die möglicherweise die Aktivität der leukozytären alkalischen Phosphatase (LAPA) beeinträchtigen. Es ist bekannt, dass einige Medikamente und andere Substanzen die Aktivität der zirkulierenden alkalischen Phosphatase beeinflussen können.⁵ Orale Kontrazeptiva, Cortisol und Stress können zu erhöhten Werten der leukozytären alkalischen Phosphatase führen.⁶

Das Verfahren unter Verwendung von Positivkontrollen durchführen. Diese können von Patienten mit pyogener Leukozytose oder von Frauen im dritten Trimester der Schwangerschaft oder in den ersten Tagen nach der Geburt gewonnen werden. Bei diesen Personengruppen liegt der Wert der alkalischen Phosphatase der Leukozyten gewöhnlich über 100. Eine Negativkontrolle kann aus einem normalen fixierten Ausstrich hergestellt werden, indem dieser zur Inaktivierung des Enzyms für 1 Minute in kochendes Wasser getaucht wird. Kontrollausstriche sind bis zu 1 Jahr haltbar, wenn sie fixiert und in Parafilm® verpackt bei –70 °C gelagert werden. Diese Ausstriche sollten mindestens 1 Stunde vor dem Fixieren und 3 Stunden nach dem Fixieren vor dem Einfrieren an der Luft getrocknet werden.

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen zu erwartenden Bereich bestimmt, der für die lokale Bevölkerung charakteristisch ist.

Das Verfahren basiert auf der subjektiven Bewertung der gefärbten Zellen. Dies kann zu einer erheblichen Schwankung bei den ermittelten Bewertungen führen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches muss zwischen 18 und 26 °C gehalten werden. Bei niedrigeren Temperaturen fallen die Ergebnisse deutlich niedriger aus. Bei Temperaturen über 30 °C steigt die Aktivität deutlich an. Eosinophilie lassen sich nicht anfärben, sind aber anhand der zweigeteilten Zellkerne und der großen refraktilen Granula zu erkennen.

Verfahren

1. 48 ml destilliertes Wasser in ein geeignetes Gefäß geben und auf eine Temperatur von 18–26 °C einstellen.
2. Herstellung der Diazoniumsalzlösung: Den Inhalt einer Echtblausalz RR-Kapsel im destillierten Wasser (aus Schritt 1) auflösen. Ein Magnetrührer kann hilfreich sein.
3. 2 ml der alkalischen Naphthol-AS-MX-Phosphatlösung zur verdünnten Diazoniumsalzlösung (aus Schritt 2) geben. Mischen.
4. Fixierlösung auf Raumtemperatur (18–26 °C) erwärmen. Die Objektträger durch Eintauchen in die Fixierlösung für 30 Sekunden fixieren. Vorsichtig 45 Sekunden lang mit entionisiertem Wasser abspülen. Die Objektträger nicht trocknen lassen.
5. Die Objektträger in die alkalische Farbmischung (aus Schritt 3) geben und für 30 Minuten bei 18–26 °C inkubieren. Die eingetauchten Objektträger vor direktem Licht schützen. Die alkalische Farbstofflösung nach Gebrauch entsorgen.
6. Die Objektträger nach 30 Minuten herausnehmen und 2 Minuten lang gründlich mit entionisiertem Wasser abspülen. Die Objektträger nicht trocknen lassen.
7. Die Objektträger für 10 Minuten in Mayer-Hämatoxylin-Lösung eintauchen.
8. Die gegengefärbten Objektträger 3 Minuten lang mit entionisiertem Wasser abspülen. Dies führt zu einer rotviolettten Färbung des Zellkerns.
9. Mikroskopisch untersuchen. Wenn das Abdecken mit einem Deckglas erforderlich ist, darf nur ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden.

Leistungsmerkmale

Bewertungsverfahren

Den Ausstrich scannen (900-fache Vergrößerung) und einen dünnen Bereich auswählen, in dem die Erythrozyten sich kaum berühren. Bereiche mit Phosphataseaktivität erscheinen als blaue Granula. 100 konsekutive segmentkernige und stabkernige neutrophile Granulozyten auswählen. Die Bewertung reicht von 0 bis 4+ auf der Grundlage der Menge und Intensität des ausgefallenen Farbstoffs im Zytoplasma dieser Zellen. Angaben zu den Charakteristika der Bewertung sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Summe der Beurteilungen von 100 Zellen wird als Ergebnis gewertet.

Tabelle 1. Charakteristika der Bewertung*

Ausgefallener Azofarbstoff im Zytoplasma				
Beurteilung der Zelle	Menge** (%)	Größe der Granula	Intensität der Färbung	Zytoplasma-Hintergrund
0+	Kein	-	Kein	Kein
1+	50	Klein	Schwach bis mäßig	Farblos bis sehr helles Blau
2+	50-80	Klein	Mäßig bis stark	Farblos bis hellblau
3+	80-100	Mittel bis groß	Stark	Farblos bis blau
4+	100	Mittel bis groß	Leuchtend	Nicht sichtbar

* Tabelle 1 zeigt eine Abwandlung der von Kaplow gemachten Beobachtungen.^{2,3}

** Prozentualer Anteil des Zytoplasmavolumens, das vom Präzipitat eines Azofarbstoffs eingenommen wird.

Zur Ermittlung der leukozytären alkalischen Phosphatase-Aktivität (LAPA) wird die Anzahl der gezählten Zellen mit dem Wert für die Beurteilung der Zellen multipliziert. Diese Zahlen werden zur Ermittlung des LAPA-Wertes addiert, wie in den folgenden Beispielen gezeigt:

Beurteilung der Zelle	Gezählter Wert	LAPA-Wert
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Gesamt	100	67

Erwartete Werte

Die folgenden Werte wurden bei Sigma-Aldrich anhand von 20 gesunden Personen ermittelt. Die Blutentnahme erfolgte in heparinisierte Röhrchen; die Ausstriche wurden innerhalb einer Stunde erstellt.

Echtblau RR	
LAPA Mittelwert ±1 SD	96±44
LAPA-Bereich	52-140

Die folgenden Werte wurden von diesen 20 gesunden Personen ermittelt:

Echtblau RR
32-182

Wenn die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen abweichen, wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von Sigma-Aldrich, um Unterstützung zu erhalten.

Erwartete Beobachtungen

Beim Menschen ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase auf reife und stabförmige Granulozyten beschränkt. Gelegentlich kann eine schwache Färbung der Lymphozyten beobachtet werden. Osteoblasten und Endothelzellen im Knochenmark zeigen eine starke Färbung.

Eine Reihe von Objektträgern wurde aus dem Blut gesunder Probanden, von Frauen im letzten Schwangerschaftstrimester, von Patientinnen zu Beginn des Wochenbetts und von Personen, bei denen eine leukämische Reaktion auftrat, hergestellt. Negativkontrollen wurden wie beschrieben mittels Hitzeinaktivierung hergestellt. Verschiedene Kombinationen mit Echtblau RR und Gegenfärbungen (Methylenblaulösung und Mayer-Hämatoxylin-Lösung) wurden wiederholt durchgeführt und die LAPA bewertet. Die anhand mehrerer Objektträger für jeden Probanden ermittelten Werte wiesen eine hohe Übereinstimmung auf. Eine Beeinflussung durch die verwendete Färbe-/Gegenfärbetechnik war nicht zu erkennen. So ergaben z. B. 7 Ausstriche aus dem Blut einer Schwangeren Werte im Bereich von 235 bis 269 mit einem Mittelwert, einer Standardabweichung und einem Variationskoeffizienten von 255, 11,3 bzw. 4,4 %. Bei den Negativkontrollen war kein gefärbtes Material zu erkennen.

Analytische Leistungsmerkmale

Die Ergebnisse der analytischen Leistung für die gegebenen Tests, die für alle Zielstrukturen durchgeführt wurden, bestätigen eine 100%ige Sensitivität, Spezifität und Wiederholbarkeit.

Kat.-Nr.	Beschreibung des Produkts	Ziel	Intra-Assay-Spezifität	Intra-Assay-Empfindlichkeit	Inter-Assay-Spezifität	Inter-Assay-Empfindlichkeit
FBS25	Echtblausalz RR	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
855	Alkalische Naphthol-AS-MX-Phosphatlösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
MHS1	Mayer-Hämatoxylin-Lösung	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
854C	Konzentrierte Citratlösung	Bereiche der Aktivität	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3

Warnungen und Gefahren

Aktuelle Risiko-, Gefahren- und Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt und auf der Produktkennzeichnung.

85L1:



H290 Kann ätzend auf Metalle wirken.

H331 Giftig beim Einatmen.

P234 Nur in der Originalverpackung aufbewahren.

P261 Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden.

P271 Nur im Freien oder an einem gut belüfteten Ort verwenden.

P304 + P340 + P311 BEIM EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie dafür, dass sie bequem atmen kann. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.

P390 Nehmen Sie verschüttete Flüssigkeiten auf, um Materialschäden zu vermeiden.

P403 + P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter luftdicht verschlossen halten.

85L2:



H290 Kann ätzend auf Metalle wirken.

H319 Verursacht schwere Augenreizungen.

H331 Giftig beim Einatmen.

P234 Nur in der Originalverpackung aufbewahren.

P261 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfe/Spray möglichst nicht einatmen.

P264 Nach der Handhabung die Haut gründlich waschen.

P271 Nur im Freien oder an einem gut belüfteten Ort verwenden.

P304 + P340 + P311 BEIM EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie dafür, dass sie bequem atmen kann. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.

P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.

Wenn während der Verwendung dieses Geräts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall eingetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und/oder seinem bevollmächtigten Vertreter sowie Ihrer nationalen Behörde.

Symbol-Definitionen

Symbole gemäß der Definition in EN ISO 15223-1:2021

	Hersteller		Katalognummer
	Anweisungen für den Gebrauch beachten		Chargencode
	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/ Europäischen Union		Konformitätserklärung der Europäischen Union (definiert in IVDR 2017/746)
	Verfallsdatum		Medizinisches In-vitro-Diagnosegerät
	Temperatur-Grenzwert		Vorsicht
	Datum der Herstellung		Importeur
	Weist auf den bevollmächtigten Vertreter in der Schweiz hin		

Referenzen

- 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
- Vorgeschlagene Norm: 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

Kontaktinformationen

Um eine Bestellung aufzugeben, besuchen Sie bitte unsere Website unter [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Für den technischen Service besuchen Sie bitte die technische Service-Seite auf unserer Website unter [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorie

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Die neue Vorlage mit aktuellem Branding wurde angewandt. In Verwendungszweck und Vorsichtsmaßnahmen wurde die Nennung der gewerblichen Verwendung hinzugefügt. Überarbeitung des Verwendungszwecks zur Angleichung an die IVDR-Richtlinien. Material Sicherheitsdatenblatt wurde in Sicherheitsdatenblatt geändert. Kontaktinformationen wurden aktualisiert. Die Anweisung, CLSI für die Probenentnahme zu befolgen, wurde entfernt. EN 980 wurde gestrichen und in EN ISO 15223-1:2021 für Symbole geändert. Kontaktinformationen für unerwünschte Ereignisse wurden hinzugefügt. Referenz Nr. 4 entfernt und Referenzen neu nummeriert. Eine Tabelle zur Revisionshistorie wurde hinzugefügt. Zusätzlicher Gefahrenhinweis für 854C-20ML und 85CH-REP-Informationen wurden hinzugefügt. Added CH-REP information.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Die Initiale M und Sigma-Aldrich sind Marken der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland oder ihrer Tochtergesellschaften. Alle anderen Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber. Ausführliche Informationen über Marken sind über öffentlich zugängliche Quellen erhältlich.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Mode d'emploi

Kit de phosphatase alcaline leucocytaire

Procédure n° 85



MERCK

Utilisation prévue

Les kits de phosphatase alcaline de Sigma-Aldrich sont destinés à la coloration histologique générale en laboratoire. Les réactifs de détection de la phosphatase alcaline sont destinés aux professionnels et à un « usage en diagnostic *in vitro* » uniquement. Cette procédure histochemie manuelle et qualitative met en évidence l'activité de la phosphatase alcaline dans les leucocytes des frottis sanguins ou de moelle osseuse humains. La visualisation histologique de la phosphatase alcaline associée aux leucocytes est une technique unique couramment utilisée en médecine.

En 1929, Kay a suggéré pour la première fois la présence de phosphatase alcaline dans les leucocytes.¹ Toutefois, ce n'est que bien des années plus tard que Kaplow a introduit une méthode de coloration pratique pour mettre en évidence l'enzyme leucocytaire.² Kaplow a utilisé le phosphate d'α-naphtyle sodique comme substrat, le Fast Blue RR comme sel de diazonium et a recommandé une méthode de détermination du score pour les comparaisons semi-quantitatives.² Il a également suggéré des améliorations permettant une bonne conservation de la morphologie cellulaire. Par la suite, le phosphate d'α-naphtyle a été remplacé par le phosphate de naphtol AS. Il convient de noter qu'une bonne corrélation a été trouvée entre les techniques cytochimiques et biochimiques pour le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire.³

Avec la méthode de Sigma-Aldrich, la phosphatase alcaline leucocytaire est déterminée sur les frottis sanguins ou médullaires une fois ceux-ci délicatement fixés sur des lames. Les frottis fixés sont ensuite incubés dans une solution contenant du phosphate de naphtol AS-MX. Sous l'effet de l'activité de la phosphatase, le naphtol AS-MX est libéré et immédiatement couplé à un sel de diazonium, formant un pigment visible et insoluble sur les sites d'activité de la phosphatase.

Réactifs

Sel Fast Blue RR (réf. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, gélules prépesées. Le poids réel par gélule varie en fonction du lot de colorant et a été optimisé par test.

Solution alcaline de phosphate de naphtol AS-MX (réf. 855-20ML)

Phosphate de naphtol AS-MX, 0,25 % (p/v), tamponné à un pH de 8,6, 25 °C. Danger. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. EN CAS D'INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Solution d'hématoxyline de Mayer (réf. MHS1-100ML)

Hématoxyline, certifiée, 1 g/l, C.I. 75290, iodate de sodium, 0,2 g/l, hydroxyde d'ammonium et d'aluminium, 5 g/l et stabilisateurs.

Solution de citrate concentré (réf. 854C-20ML)

Acide citrique-citrate de sodium, 1,5 mol/l. Danger. Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Peut irriter les voies respiratoires. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Matériel spécial requis mais non fourni

- Concentré de substitut à l'eau courante de Scott, réf. S5134
- Acétone, de qualité réactif ou de qualité ACS

Conservation et stabilité

Conserver le sel Fast Blue RR à une température inférieure à 0 °C. Conserver la solution alcaline de phosphate de naphtol AS-MX au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation.

Conserver la solution d'hématoxyline de Mayer hermétiquement fermée à température ambiante (entre 18 et 26 °C) à l'abri de la lumière. Ne pas remettre la solution dans son récipient d'origine après l'avoir utilisée dans une cuve à coloration de Coplin. La jeter lorsque le temps nécessaire pour obtenir une coloration adéquate dépasse de plus de 5 minutes le temps recommandé dans la procédure.

Conserver la solution de citrate concentré à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Conserver la solution de travail de citrate au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Les solutions de citrate peuvent être utilisées en l'absence de croissance microbienne.

Préparation

Le sel Fast Blue RR, la solution alcaline de phosphate de naphtol AS-MX et la solution d'hématoxyline de Mayer sont fournis prêts à l'emploi pour la procédure.

Préparer la solution de travail de citrate en diluant 2 ml de solution de citrate concentré à 100 ml d'eau déionisée.

Pour préparer la solution de fixation (acétone tamponnée au citrate, 60 %), équilibrer la solution de travail de citrate à température ambiante (entre 18 et 26 °C). En mélangeant constamment, ajouter 2 volumes de solution de travail de citrate à 3 volumes d'acétone. Jeter après utilisation.

La solution de travail du substitut à l'eau courante de Scott est préparée en diluant 1 volume de concentré de substitut à l'eau courante de Scott avec 9 volumes d'eau déionisée.

Précautions

Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à être utilisés en diagnostic *in vitro* au sein de laboratoires de biologie médicale. Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à un usage professionnel par un personnel qualifié uniquement. Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de Sigma-Aldrich peuvent être utilisés par le personnel de laboratoire formé à la manipulation d'échantillons humains potentiellement infectieux, à l'utilisation de microscopes et d'autres équipements de laboratoire et possédant une perception des couleurs et une acuité visuelle permettant de distinguer les couleurs ainsi que les autres objets au microscope.

Suivre les précautions habituelles lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets en respectant toutes les réglementations locales et nationales.

Procédure

Prélèvement des échantillons

Il est possible d'utiliser des frottis sanguins ou médullaires fraîchement préparés ou bien des échantillons anticoagulés avec de l'héparine.⁴ ÉVITER L'EDTA.⁴ Les frottis sanguins doivent être colorés dans les 8 heures suivant leur préparation pour rechercher l'activité enzymatique. Toutefois, si cela n'est pas possible, la perte progressive de l'activité de la phosphatase alcaline peut être retardée en les fixant et en les stockant pendant une nuit au congélateur.⁴ Les frottis doivent être séchés pendant au moins 1 heure avant de les fixer et pendant 3 heures après avoir été fixés avant de pouvoir être congelés.

Remarques

Il existe peu de données concernant les composés susceptibles d'interférer avec l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire (PAL). Certains médicaments et d'autres substances sont connus comme ayant un impact sur l'activité de la phosphatase alcaline circulante.⁵ Les contraceptifs oraux, le cortisol et le stress peuvent entraîner une augmentation des scores de la phosphatase alcaline leucocytaire.⁶

Réaliser la procédure en utilisant des contrôles positifs. Ces contrôles peuvent provenir de patients atteints d'une hyperleucocytose d'origine infectieuse ou bien de femmes au troisième trimestre de grossesse ou pendant les premiers jours après la naissance. Les scores de la phosphatase alcaline leucocytaire chez ces personnes dépassent généralement 100. Un contrôle négatif peut être préparé à partir d'un frottis fixé normal en l'immergeant dans de l'eau bouillante pendant 1 minute afin d'inactiver l'enzyme. Les frottis de contrôle peuvent être conservés jusqu'à 1 an s'ils sont stockés fixés, enveloppés dans du Parafilm® à -70 °C. Ces frottis doivent être séchés à l'air libre pendant au moins 1 heure avant d'être fixés et pendant 3 heures après avoir été fixés pour pouvoir être congelés.

Il est vivement recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de valeurs attendues, caractéristique de la population locale.

La procédure dépend de l'évaluation subjective des cellules colorées. Cela peut entraîner une grande variation des scores obtenus. La température du mélange réactionnel doit être maintenue entre 18 et 26 °C. Des températures plus basses entraînent des résultats (scores) nettement inférieurs. Au-dessus de 30 °C, une augmentation marquée de l'activité se produit. Les éosinophiles ne se colorent pas, mais ils peuvent être reconnus grâce à leurs noyaux bilobés et à la présence de gros granules réfractaires.

Procédure

- Mesurer 48 ml d'eau distillée dans un récipient approprié et ajuster la température entre 18 et 26 °C.
- Préparer la solution de sel de diazonium : Dissoudre le contenu d'une gélule de sel Fast Blue RR dans de l'eau distillée (de l'étape 1). Un agitateur magnétique peut être utile.
- Ajouter 2 ml de solution alcaline de phosphate de naphtol AS-MX à la solution de sel de diazonium diluée (de l'étape 2). Mélanger.
- Équilibrer la solution de fixation à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Fixer les lames en les immergeant dans la solution de fixation pendant 30 secondes. Rincer délicatement à l'eau déionisée pendant 45 secondes. Ne pas laisser les lames sécher.
- Ajouter les lames au mélange colorant alcalin (de l'étape 3) et laisser incubé entre 18 et 26 °C pendant 30 minutes. Protéger les lames immergées de la lumière directe. Jeter le mélange colorant alcalin après utilisation.
- Au bout des 30 minutes, retirer les lames et les rincer soigneusement dans de l'eau déionisée pendant 2 minutes. Ne pas laisser les lames sécher.
- Placer les lames dans la solution d'hématoxyline de Mayer pendant 10 minutes.
- Rincer les lames contre-colorées pendant 3 minutes dans de l'eau déionisée. Les noyaux se coloreront alors en rouge-violet.
- Examiner les lames au microscope. S'il est nécessaire de monter les lames avec des lamelles couvre-objet, utiliser uniquement un milieu de montage aqueux.

Caractéristiques de performance

Méthode de détermination du score

Examiner le frottis (à l'objectif 900x) et sélectionner une petite zone où les érythrocytes se touchent à peine. Les sites d'activité de la phosphatase apparaissent sous forme de granulations bleues. Sélectionner 100 granulocytes neutrophiles segmentés et en forme de bande consécutifs. Leur attribuer un score compris entre 0 et 4+ en fonction de la quantité et de l'intensité du colorant précipité à l'intérieur du cytoplasme de ces cellules. Pour les caractéristiques de détermination du score, voir le Tableau 1. La somme des scores de 100 cellules est considérée comme le score final.

Tableau 1. Caractéristiques de détermination du score*

Colorant azoïque précipité à l'intérieur du cytoplasme				Fond du cytoplasme
Score des cellules	Quantité** (%)	Taille des granulations	Intensité de la coloration	
0+	Aucune	-	Aucune	Aucun
1+	50	Petite	Faible à modérée	Incolore à bleu très pâle
2+	50-80	Petite	Modérée à forte	Incolore à bleu pâle
3+	80-100	Moyenne à grande	Forte	Incolore à bleu
4+	100	Moyenne à grande	Intense	Non visible

* Le Tableau 1 constitue une modification des observations faites par Kaplow.^{2,3}
 ** Pourcentage du volume du cytoplasme occupé par le colorant azoïque précipité.

Pour obtenir le score d'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire (activité PAL), le nombre de cellules comptées est multiplié par la valeur du score des cellules. Ces chiffres sont ensuite additionnés pour obtenir le score final d'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire, comme le montrent les exemples suivants :

Score des cellules	Score compté	Score d'activité PAL
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

Valeurs attendues

Les scores suivants ont été obtenus chez Sigma-Aldrich pour 20 individus en bonne santé. Le sang a été prélevé dans des tubes contenant de l'héparine et les frottis ont été préparés dans l'heure qui a suivi.

Fast Blue RR	
Activité PAL moyenne ± 1 ET	96±44
Plage activité PAL	52-140

La plage suivante de scores a été obtenue à partir de ces 20 individus en bonne santé :

Fast Blue RR
32-182

Si les résultats observés diffèrent des résultats attendus, contacter le service technique de Sigma-Aldrich pour obtenir de l'aide.

Observations attendues

Chez l'homme, l'activité de la phosphatase alcaline est limitée aux granulocytes matures et aux granulocytes en bande. Parfois, une faible coloration peut être observée dans les lymphocytes. Les ostéoblastes de la moelle osseuse et les cellules endothéliales sont fortement colorés.

Une série de lames a été préparée à partir de sang issu de sujets en bonne santé, de femmes au dernier trimestre de grossesse, de patientes en début de post-partum et d'individus présentant une réaction leucémoïde. Des contrôles négatifs ont été préparés par inactivation thermique comme décrit. Diverses combinaisons de Fast Blue RR et de contre-colorants (solution de bleu de méthylène et solution d'hématoxyline de Mayer) ont été testées à plusieurs reprises et l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire (LAPA) a été déterminée. Les valeurs obtenues sur plusieurs lames préparées pour chaque sujet étaient en étroite concordance et ne semblaient pas être influencées par la technique de coloration/contre-coloration utilisée. Par exemple, 7 frottis réalisés avec le sang d'une patiente en période prénatale ont donné des résultats allant de 235 à 269 avec une moyenne, un écart-type et un coefficient de variation de 255, 11,3 et 4,4 % respectivement. Les contrôles négatifs ont révélé une absence totale de matériel coloré.

Caractéristiques de performance analytique

Les résultats des performances analytiques pour les tests concernés effectués sur toutes les structures cibles confirment une sensibilité, une spécificité et une répétabilité de 100 %.

Réf.	Description du produit	Cible	Spécificité intra-série	Sensibilité intra-série	Spécificité inter-séries	Sensibilité inter-séries
FBS25	Sel Fast Blue RR	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
855	Solution alcaline de phosphate de naphтол AS-MX	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
MHS1	Solution d'hématoxyline de Mayer	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
854C	Solution de citrate concentré	Sites d'activité	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3

Avertissements et risques

Se reporter à la fiche de données de sécurité et à l'étiquetage du produit pour obtenir des informations mises à jour concernant les risques, les dangers et la sécurité.

85L1 :



H290 Peut être corrosif pour les métaux.

H331 Toxique par inhalation.

P234 Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P261 Éviter de respirer les brouillards ou les vapeurs.

P271 Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.

P304 + P340 + P311 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P390 Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.

P403 + P233 Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

85L2 :



H290 Peut être corrosif pour les métaux.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H331 Toxique par inhalation.

P234 Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P264 Se laver la peau soigneusement après manipulation.

P271 Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.

P304 + P340 + P311 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Si, au cours de l'utilisation de ce dispositif ou à la suite de son utilisation, un incident grave se produit, le signaler au fabricant et/ou à son représentant agréé ainsi qu'aux autorités nationales compétentes.

Définition des symboles

Symboles tels que définis dans la norme EN ISO 15223-1:2021

	Fabricant		Référence catalogue
	Consulter le mode d'emploi		Numéro du lot
	Représentant agréé dans la Communauté européenne/ l'Union européenne		Déclaration de conformité de l'Union européenne (définie dans le règlement 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i>)
	Date limite d'utilisation		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Limites de température		Attention
	Date de fabrication		Importateur
	Indique le représentant agréé en Suisse		

Références

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

Coordonnées

Pour passer commande, consulter notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Pour le service technique, consulter la page du service technique sur notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historique des révisions

Rév. 2.0	2014
Rév. 3.0	2016
Rév. 4.0	2023

Transfert vers un nouveau modèle avec l'image de marque actuelle. Précision de l'usage professionnel dans l'utilisation prévue et les précautions. Révision de l'utilisation prévue afin de l'aligner sur les recommandations de la réglementation relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Remplacement du texte « Material Safety Data Sheet » par « Safety Data Sheet » dans la version anglaise. Mise à jour des coordonnées. Suppression de l'instruction indiquant de suivre les normes et recommandations du CLSI pour le prélèvement des échantillons. Remplacement de la norme EN 980 par la norme EN ISO 15223-1:2021 pour les symboles. Ajout de coordonnées en cas d'événements indésirables. Suppression de la référence bibliographique n° 4 et renumérotation des références. Ajout d'un tableau d'historique des révisions. Ajout d'une mention de danger supplémentaire pour les références catalogue 854C-20ML et 855-20ML. Ajout de la section relative aux avertissements et risques. Ajout des informations sur le représentant agréé en Suisse.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Le M majuscule et Sigma-Aldrich sont des marques de commerce de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne ou de ses filiales. Toutes les autres marques sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. Des informations détaillées sur les marques de commerce sont disponibles via des ressources accessibles au public.

Istruzioni per l'uso

Kit per fosfatasi alcalina leucocitaria

Procedura n. 85



Uso previsto

I kit per fosfatasi alcalina Sigma-Aldrich sono intesi come coloranti istologici generali per uso di laboratorio. I reagenti per fosfatasi alcalina sono destinati soltanto alla "diagnostica in vitro" professionale. Questa procedura qualitativa manuale istochimica rileva l'attività di fosfatasi alcalina nei leucociti di strisci ematici o midollari di campioni umani. La visualizzazione istologica della fosfatasi alcalina associata ai leucociti è una tecnica unica al momento comunemente utilizzata in medicina.

Nel 1929, Kay descrisse per la prima volta la presenza di fosfatasi alcalina nei leucociti.¹ Tuttavia, dovettero trascorrere molti anni prima che Kaplow introducesse una pratica metodica di colorazione per dimostrare l'enzima leucocitario.² Kaplow utilizzò sodio α-naftil fosfato come substrato, fast blue RR come sale di diazonio e raccomandò una scala di punteggio per i confronti semiquantitativi.² Inoltre, vennero proposte migliorie da cui derivò una buona conservazione della morfologia cellulare. Successivamente, α-naftil fosfato fu sostituito dal naftolo AS fosfato. È interessante notare che è stata trovata una buona correlazione tra le tecniche citochimiche e biochimiche per l'analisi dell'attività della fosfatasi alcalina nei leucociti (LAPA).³

Con la metodica Sigma-Aldrich, la fosfatasi alcalina leucocitaria viene determinata negli strisci ematici o midollari dopo che sono stati delicatamente fissati ai vetrini. Gli strisci fissati vengono quindi incubati in una soluzione contenente naftolo AS-MX fosfato. L'attività della fosfatasi favorisce il rilascio di naftolo AS-MX, che si lega immediatamente con un sale di diazonio, formando un pigmento visibile e insolubile nelle sedi di attività della fosfatasi.

Reagenti

Sale Fast Blue RR (N. di cat. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, capsule prepesate. Il peso effettivo per capsula varierà in funzione della purezza del lotto di colorante ed è stato ottimizzato mediante saggio.

Soluzione alcalina di naftolo AS-MX fosfato (N. di cat. 855-20ML)

Naftolo AS-MX fosfato, 0,25% (w/v), tamponato a pH 8,6, 25 °C. Pericolo. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può irritare le vie respiratorie. Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Soluzione di ematosilina di Mayer (N. di cat. MHS1-100ML)

Ematosilina, certificata, 1 g/l, C.I. 75290, iodato di sodio, 0,2 g/l, idrossido di alluminio e ammonio, 5 g/l e stabilizzanti

Soluzione concentrata di citrato (N. di cat. 854C-20ML)

Acido citrico-sodio citrato, 1,5 mol/l. Pericolo. Provoca irritazione cutanea. Provoca gravi lesioni oculari. Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. Può irritare le vie respiratorie. Indossare guanti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

Materiali specifici necessari, ma non forniti in dotazione

- Concentrato di soluzione di Scott sostitutiva dell'acqua di rubinetto, N. di cat. S5134
- Acetone, reagente di grado ACS

Conservazione e stabilità

Conservare il sale Fast Blue RR a una temperatura inferiore a 0 °C. Conservare la soluzione alcalina di naftolo AS-MX fosfato in frigorifero (2-8 °C). I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

Conservare la soluzione di ematosilina di Mayer in un flacone ben chiuso, a temperatura ambiente (18-26 °C), al riparo dalla luce. Non reintrodurre la soluzione nel contenitore originale dopo l'uso in vaschetta tipo Coplin. Scartarla quando il tempo per ottenere una colorazione idonea è più lungo di oltre 5 minuti rispetto a quello raccomandato nella procedura.

Conservare la soluzione concentrata di citrato a temperatura ambiente (18-26 °C). Conservare la soluzione di lavoro a base di citrato in frigorifero (2-8 °C). Le soluzioni diluite a base di citrato sono idonee per l'uso in assenza di crescita microbica visibile.

Preparazione

Il sale Fast Blue RR, la soluzione alcalina di naftolo AS-MX fosfato e la soluzione di ematosilina di Mayer sono forniti pronti per l'uso nella procedura.

Per preparare la soluzione di lavoro a base di citrato, diluire con acqua deionizzata 2 ml di soluzione concentrata di citrato fino a ottenere 100 ml.

Per preparare la soluzione fissativa (acetone tamponato con citrato, 60%), scaldare la soluzione di lavoro a base di citrato a temperatura ambiente (18-26 °C). Mantenendo la miscela in costante agitazione, aggiungere 2 volumi di soluzione di lavoro a base di citrato a 3 volumi di acetone. Scartare dopo l'uso.

Per preparare la soluzione di lavoro di Scott sostitutiva dell'acqua di rubinetto, diluire 1 volume di concentrato di soluzione di Scott sostitutiva dell'acqua di rubinetto con 9 volumi di acqua deionizzata.

Precauzioni

Questi IVD sono destinati alla diagnostica in vitro in un ambiente di laboratorio clinico. Questi IVD sono destinati esclusivamente all'uso professionale da parte di personale qualificato. Gli IVD Sigma-Aldrich devono essere utilizzati da personale di laboratorio addestrato alla manipolazione di campioni biologici umani potenzialmente infettivi, come anche all'uso di microscopi e altre apparecchiature di laboratorio, che abbia la percezione del colore e l'acuità visiva necessari a distinguere i colori e altri oggetti al microscopio.

Seguire le normali precauzioni adottate nella manipolazione dei reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti attenendosi a tutte le normative vigenti a livello locale, provinciale, regionale o nazionale.

Procedura

Raccolta dei campioni

È possibile utilizzare strisci o campioni di sangue o midollo osseo preparati al momento, con eparina.⁴ EVITARE EDTA.⁴ Gli strisci ematici devono essere colorati per l'attività enzimatica entro 8 ore dalla preparazione. Tuttavia, se ciò non fosse possibile, la graduale perdita di attività della fosfatasi alcalina può essere ritardata mediante fissazione e conservazione durante la notte in congelatore.⁴ Gli strisci devono essere asciugati almeno 1 ora prima della fissazione e 3 ore dopo la fissazione prima di riporli in congelatore.

Note

Sono scarsi i dati riguardanti i composti che possono interferire con l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (LAPA). È noto che alcuni farmaci e altre sostanze influenzano l'attività della fosfatasi alcalina in circolo.⁵ I contraccettivi orali, il cortisolo e lo stress possono produrre un punteggio elevato alla valutazione della fosfatasi alcalina leucocitaria.⁶

Eseguire la procedura utilizzando controlli positivi. Questi possono essere ottenuti da pazienti con leucitosi piogenica o da donne al terzo trimestre di gravidanza o durante i primi giorni dopo il parto. I punteggi assegnati alla valutazione della fosfatasi alcalina leucocitaria in questi individui sono in genere superiori a 100. È possibile preparare un controllo negativo da un normale striscio fissato immergendolo in acqua bollente per 1 minuto per inattivare l'enzima. Gli strisci di controllo possono essere conservati fino a 1 anno se fissati, avvolti in Parafilm® a -70 °C. Questi strisci devono essere asciugati all'aria almeno 1 ora prima della fissazione e 3 ore dopo la fissazione prima di essere riposti in congelatore.

Si raccomanda vivamente che ogni laboratorio stabilisca un proprio range di riferimento, caratteristico per la popolazione locale.

La procedura dipende dalla valutazione soggettiva delle cellule colorate. Ciò può comportare un'ampia variazione delle valutazioni ottenute. La temperatura della miscela di reazione deve essere mantenuta tra 18 °C e 26 °C. Temperature più basse daranno punteggi significativamente più bassi, temperature superiori a 30 °C punteggi marcatamente più elevati. Gli eosinofili non si colorano, ma si possono riconoscere dai nuclei bilobati e dai grossi granuli refrattari.

Procedura

1. Versare 48 ml di acqua distillata in un contenitore idoneo e regolare la temperatura a 18-26 °C.
2. Preparare la soluzione di sale di diazonio: sciogliere il contenuto di una capsula di sale Fast Blue RR in acqua distillata (dal punto 1). Può essere utile un agitatore magnetico.
3. Aggiungere 2 ml di soluzione alcalina di naftolo AS-MX fosfato alla soluzione di sale di diazonio diluito (punto 2). Mescolare.
4. Portare la soluzione fissativa a temperatura ambiente (18-26 °C). Fissare i vetrini immergendoli nella soluzione fissativa per 30 secondi. Sciacquare delicatamente con acqua deionizzata per 45 secondi. Non far asciugare i vetrini.
5. Immergere i vetrini nella miscela soluzione alcalina-colorante (punto 3) e incubare a 18-26 °C per 30 minuti. Tenere i vetrini al riparo dalla luce diretta. Scartare la miscela soluzione alcalina-colorante dopo l'uso.
6. Trascorsi 30 minuti, prelevare i vetrini e sciacquarli accuratamente con acqua deionizzata per 2 minuti. Non far asciugare i vetrini.
7. Immergere i vetrini nella soluzione di ematosilina di Mayer per 10 minuti.
8. Sciacquare i vetrini trattati con controcolorazione con acqua deionizzata per 3 minuti. In questo modo si otterrà una colorazione nucleare di colore rosso-violetto.
9. Esaminare al microscopio. Se è necessario applicare vetrini coprioggetto, utilizzare solo un mezzo di montaggio acquoso.

Caratteristiche prestazionali

Metodo di valutazione

Eseguire la scansione del vetrino (900X) e selezionare un'area sottile in cui gli eritrociti a malapena si toccano. Le sedi di attività della fosfatasi appariranno come granuli blu. Selezionare 100 granulociti neutrofili segmentati e a banda consecutivi. Assegnare un punteggio da 0 a 4+ in funzione della quantità e dell'intensità del colorante precipitato riscontrabile all'interno del citoplasma di queste cellule. Per le caratteristiche del punteggio, consultare la Tabella 1. La somma delle valutazioni di 100 cellule dà il punteggio finale.

Tabella 1. Caratteristiche del punteggio*

Colorante azoico precipitato nel citoplasma				Sfondo del citoplasma
Valutazione per cellula	Quantità** (%)	Dimensioni del granulo	Intensità della colorazione	
0+	Ness.	-	Ness.	Ness.
1+	50	Piccolo	Da debole a moderata	Da incolore a blu molto pallido
2+	50-80	Piccolo	Da moderata a forte	Da incolore a blu pallido
3+	80-100	Da medio a grande	Forte	Da incolore a blu
4+	100	Da medio a grande	Brillante	Non visibile

* La Tabella 1 illustra l'oscillazione delle osservazioni fatte da Kaplow.^{2,3}

** Percentuale del volume di citoplasma occupato dal precipitato di colorante azoico.

Per ottenere il punteggio dell'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (LAPA), moltiplicare il numero di cellule contate per il valore risultante dalla valutazione per singola cellula. Sommando queste cifre si ottiene il punteggio LAPA come esemplificato di seguito:

Valutazione per cellula	Punteggio contato	Punteggio LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totale	100	67

Valori attesi

I seguenti punteggi sono stati ottenuti presso Sigma-Aldrich per 20 soggetti sani. Il sangue è stato prelevato in provette eparinizzate e gli strisci sono stati preparati entro un'ora.

Fast Blue RR	
Valore medio di LAPA ± 1SD	96±44
Range di LAPA	52-140

Sui 20 soggetti sani in questione il range di oscillazione dei punteggi è stato il seguente:

Fast Blue RR
32-182

Se i risultati osservati differiscono dai risultati attesi, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica di Sigma-Aldrich.

Osservazioni attese

Nell'uomo, l'attività della fosfatasi alcalina è limitata ai granulociti maturi e a banda. Talvolta nei linfociti si può riscontrare una colorazione debole. Gli osteoblasti e le cellule endoteliali del midollo osseo si colorano marcatamente.

È stata preparata una serie di vetrini utilizzando sangue ottenuto da soggetti normali, donne nell'ultimo trimestre di gravidanza o nel primo periodo del postpartum, e individui che evidenziavano una reazione leucemoide. I controlli negativi sono stati preparati mediante inattivazione termica come descritto. Varie combinazioni di Fast Blue RR e coloranti di contrasto (soluzione di blu di metilene e soluzione di ematossilina di Mayer) sono state eseguite su repliche ed è stato valutato il punteggio LAPA. I valori ottenuti su più vetrini preparati su ciascun soggetto sono risultati molto simili e non è sembrato che avessero risentito della tecnica di colorazione/controcolorazione impiegata. Ad esempio, 7 strisci preparati con il sangue di un paziente nel periodo prenatale hanno fatto registrare punteggi di 235-269 con una media, deviazione standard e coefficiente di variazione rispettivamente di 255, 11,3 e 4,4%. I controlli negativi hanno rivelato una completa assenza di materiale colorato.

Caratteristiche di prestazione analitica

I risultati delle prestazioni analitiche per i test dati condotti su tutte le strutture target confermano una sensibilità, specificità e ripetibilità del 100%.

N. di cat.	Descrizione del prodotto	Target	Specificità intra-saggio	Sensibilità intra-saggio	Specificità inter-saggio	Sensibilità inter-saggio
FBS25	Sale Fast Blue RR	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
855	Soluzione alcalina di naftolo AS-MX fosfato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
MHS1	Soluzione di ematossilina di Mayer	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
854C	Soluzione concentrata di citrato	Sedi di attività	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3

Avvertenze e pericoli

Per informazioni aggiornate su rischi, precauzioni e sicurezza, consultare la scheda dati di sicurezza e l'etichetta del prodotto.

85L1:



H290 Può essere corrosivo per i metalli.

H331 Tossico se inalato.

P234 Conservare soltanto nell'imballaggio originale.

P261 Evitare di respirare la nebbia o i vapori.

P271 Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.

P304 + P340 + P311 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P390 Assorbire la fuoriuscita per evitare danni materiali.

P403 + P233 Conservare in un luogo ben ventilato. Tenere il contenitore ben chiuso.

85L2:



H290 Può essere corrosivo per i metalli.

H319 Provoca grave irritazione oculare.

H331 Tossico se inalato.

P234 Conservare soltanto nell'imballaggio originale.

P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P264 Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso.

P271 Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.

P304 + P340 + P311 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

Se durante l'utilizzo di questo dispositivo, o a seguito di questo, si è verificato un grave incidente, segnalarlo al fabbricante e/o al suo rappresentante autorizzato e alla propria autorità nazionale.

Definizioni dei simboli

Simboli da usare in conformità con la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabbricante		Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Codice del lotto
	Mandatario nella Comunità europea/Unione europea		Dichiarazione di conformità dell'Unione europea (definita in IVDR 2017/746)
	Data di scadenza		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Limite di temperatura		Attenzione
	Data di fabbricazione		Importatore
	Mandatario in Svizzera		

Bibliografia

- 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.
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581.
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250.

Recapiti

Per effettuare un ordine, visitare il nostro sito web all'indirizzo [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Per il servizio di assistenza tecnica, visitare l'apposita pagina dedicata sul nostro sito web all'indirizzo [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Cronologia delle revisioni

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Trasferito a un nuovo modello con il marchio attuale. Specificato "per uso professionale" nelle sezioni "Uso previsto" e "Precauzioni". Modificata la sezione "Uso previsto" per allinearla alle linee guida dell'IVDR. Modificato "scheda dati di sicurezza dei materiali" in "scheda dati di sicurezza". Aggiornati i recapiti. Eliminate le istruzioni per conformarsi allo standard CLSI per la raccolta dei campioni. Sostituita l'indicazione della norma EN 980 con quella della norma EN ISO 15223-1:2021 per i simboli. Aggiunti recapiti da contattare in caso di eventi avversi. Eliminato riferimento bibliografico n. 4 e rinumerata la bibliografia. Aggiunta la cronologia delle revisioni. Aggiunto ulteriore consiglio di prudenza per 854C-20ML e 855-20ML. Aggiunta la sezione "Avvertenze e pericoli". Aggiunta informazione per Mandatario in Svizzera.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

L'iniziale "M" e Sigma-Aldrich sono marchi commerciali di Merck KGaA, Darmstadt, Germania o delle sue affiliate. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi proprietari. Informazioni dettagliate sui marchi sono disponibili tramite risorse accessibili pubblicamente.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Instrucciones de uso

Kit de fosfatasa alcalina leucocitaria

Procedimiento n.º 85



Uso previsto

Los kits de fosfatasa alcalina Sigma-Aldrich están pensados como tinción histológica de uso general en laboratorios. Los reactivos de fosfatasa alcalina son exclusivamente para "uso diagnóstico in vitro" profesional. Este procedimiento manual semicuantitativo detecta la actividad fosfatasa alcalina en los leucocitos en sangre o en láminas de médula ósea humanas. La visualización histológica de la fosfatasa alcalina asociada representa una técnica única en la actualidad y es comúnmente utilizada en medicina.

En 1929, Kay sugirió por primera vez la presencia de fosfatasa alcalina en los leucocitos.¹ Sin embargo, Kaplow no introdujo hasta muchos años después un método de tinción práctico para demostrar la enzima leucocitaria.² Kaplow utilizó el α-naftil fosfato de sodio como sustrato, el Fast Blue RR como sal de diazonio y recomendó un método de puntuación para realizar comparaciones semicuantitativas.² También, sugirió mejoras que permitieran una buena conservación de la morfología celular. Posteriormente, se sustituyó el α-naftil fosfato por el fosfato de naftol AS. Cabe destacar que se ha encontrado una buena correlación entre las técnicas citoquímicas y bioquímicas para evaluar la actividad del fosfato alcalino leucocitario (LAPA).³

Con el método de Sigma-Aldrich, se determina la fosfatasa alcalina de los leucocitos en láminas de sangre o de médula ósea después de haberlas fijado suavemente en portaobjetos. A continuación, las láminas fijadas se incuban en una solución que contiene fosfato de naftol AS-MX. Como resultado de la actividad de la fosfatasa, el naftol AS-MX se libera y se acopla inmediatamente con una sal de diazonio, formando un pigmento insoluble y visible en los sitios de actividad de la fosfatasa.

Reactivos

Sal Fast Blue RR (N.º de cat. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, Cápsulas prepesadas. El peso real por cápsula variará en función del lote de tinte y ha sido optimizado por ensayo.

Solución alcalina de fosfato naftol AS-MX (N.º de cat. 855-20ML)

Fosfato de naftol AS-MX, al 0,25 % (p/v), amortiguado a pH 8,6, 25 °C. Peligro. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede irritar las vías respiratorias. Evitar respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles. EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

Solución de hematoxilina de Mayer (N.º de cat. MHS1-100ML)

Hematoxilina certificada, 1 g/l, C.I. 75290, yodato sódico, 0,2 g/l, hidróxido amónico de aluminio, 5 g/l, y estabilizadores

Solución de concentrado de citrato (N.º de cat. 854C-20ML)

Ácido cítrico-citrato de sodio, 1,5 mol/l. Peligro. Provoca irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. Evitar respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles. Puede irritar las vías respiratorias. Usar guantes/equipo de protección para los ojos/la cara.

Material especial necesario pero no suministrado

- Concentrado sustituto del agua corriente de Scott, n.º de catálogo S5134
- Acetona, reactivo ACS

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar la sal Fast Blue RR por debajo de 0 °C. Almacenar la solución alcalina de fosfato de naftol AS-MX 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) protegida de la luz. No devolver la solución al envase original después de su uso en el frasco Coplin. Descartar cuando el tiempo necesario para una tinción adecuada supere en más de 5 minutos el tiempo recomendado en el procedimiento.

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

Preparación

La sal Fast Blue RR, la solución alcalina de fosfato naftol AS-MX 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 concentrada de citrato a 100 ml con agua desionizada.

Para preparar la solución fijadora (acetona amortiguada con citrato, al 60 %), calentar la solución de trabajo de citrato a temperatura ambiente (18-26 °C). Con agitación constante, añadir 2 volúmenes de solución de trabajo de citrato a 3 volúmenes de acetona. Desechar después de su uso.

La solución de trabajo del sustituto del agua corriente de Scott se prepara diluyendo 1 volumen del concentrado sustitutivo del agua corriente de Scott con 9 volúmenes de agua desionizada.

Precauciones

Estos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (DMDIV) están destinados a un uso de diagnóstico in vitro en un entorno de laboratorio clínico. Estos DMDIV están destinados a un uso profesional por parte de personal cualificado. El personal de laboratorio capacitado de Sigma-Aldrich puede utilizar los DMDIV para manipular muestras humanas que puedan ser infecciosas, utilizar microscopios y otros equipos de laboratorio y tener percepción de los colores y agudeza visual para distinguir los colores y otros objetos bajo el microscopio.

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Se deben eliminar los residuos respetando todas las normativas locales, estatales, regionales o nacionales.

Procedimiento

Recogida de la muestra

Pueden utilizarse láminas de sangre fresca o de médula ósea o muestras anticoaguladas con heparina.⁴ EVITAR EL EDTA.⁴ Los frotis de sangre deben teñirse para detectar la actividad enzimática dentro de las 8 horas siguientes a su preparación. Sin embargo, si esto no es posible, la pérdida gradual de la actividad de la fosfatasa alcalina puede retrasarse mediante la fijación y el almacenamiento durante la noche en el congelador.⁴ Las láminas deben secarse al menos 1 hora antes de la fijación y 3 horas después de la fijación antes de la congelación.

Notas

Hay pocos datos sobre los compuestos que pueden interferir con la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria (LAPA). Se sabe que ciertos fármacos y otras sustancias influyen en la actividad de la fosfatasa alcalina circulante.⁵ Los anticonceptivos orales, el cortisol y el estrés pueden provocar un aumento de la fosfatasa alcalina leucocitaria.⁶

Realizar el procedimiento utilizando controles positivos. Pueden obtenerse de pacientes con leucocitosis piogénica, o de mujeres en el tercer trimestre del embarazo o durante los primeros días del puerperio. Las puntuaciones de la fosfatasa alcalina leucocitaria de estas personas suelen ser superiores a 100. Se puede preparar un control negativo a partir de un frotis normal fijado sumergiéndolo en agua hirviendo durante 1 minuto para inactivar la enzima. Las láminas de control pueden conservarse hasta 1 año si se almacenan fijadas, envueltas en Parafilm® a -70 °C. Estas láminas deben secarse al aire al menos 1 hora antes de la fijación y 3 horas después de la fijación antes de la congelación.

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio intervalo esperado, característico para la población local.

El procedimiento depende de la valoración subjetiva de las células teñidas. Esto puede dar lugar a una amplia variación de las clasificaciones obtenidas. La temperatura de la mezcla de reacción debe mantenerse entre 18-26 °C. Las temperaturas más bajas darán lugar a puntuaciones significativamente más bajas. Por encima de los 30 °C, se produce un marcado aumento de la actividad. Los eosinófilos no se tiñen, pero pueden reconocerse por sus núcleos bilobulados y los grandes gránulos refractarios.

Procedimiento

- Medir 48 ml de agua destilada en un recipiente adecuado y ajustar la temperatura a 18-26 °C.
- Preparar la solución de sal de diazonio: Disolver el contenido de una cápsula de sal Fast Blue RR en agua destilada (del paso 1). Un agitador magnético puede ser útil.
- Añadir 2 ml de solución alcalina de naftol AS-MX a la solución de sal de diazonio diluida (Paso 2). Mezclar.
- Llevar la solución fijadora a temperatura ambiente (18-26 °C). Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en la solución fijadora durante 30 segundos. Aclarar suavemente en agua desionizada durante 45 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
- Añadir los portaobjetos a la mezcla alcalina-tinte (del paso 3) e incubar a 18-26 °C durante 30 minutos. Proteger los portaobjetos sumergidos de la luz directa. Desechar la mezcla alcalina-tinte después de su uso.
- Después de 30 minutos, retirar los portaobjetos y enjuagarlos a fondo en agua desionizada durante 2 minutos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
- Colocar los portaobjetos en solución de hematoxilina de Mayer durante 10 minutos.
- Aclarar los portaobjetos teñidos, durante 3 minutos en agua desionizada. Esto dará lugar a una tinción nuclear de color rojo violeta.
- Evaluar al microscopio. Si se requiere un cubreobjetos, utilizar únicamente un medio de montaje acuoso.

Características de funcionamiento

Método de puntuación

Examinar la lámina (900X) y seleccione una zona fina en la que los eritrocitos apenas se toquen. Los sitios de actividad de la fosfatasa aparecerán como gránulos azules. Seleccionar 100 granulocitos neutrófilos consecutivos segmentados y en forma de cayado. Clasificar de 0 a 4+ en función de la cantidad e intensidad del colorante precipitado en el citoplasma de estas células. Para conocer las características de la puntuación, consultar la tabla 1. La suma de las valoraciones de 100 células se considera la puntuación.

Tabla 1. Características de la puntuación*

Tinte azoico precipitado en el citoplasma				
Clasificación de las células	Cantidad** (%)	Tamaño del gránulo	Intensidad de la tinción	Fondo del citoplasma
0+	Ninguno	-	Ninguno	Ninguno
1+	50	Pequeño	De débil a moderada	De incoloro a rosa muy pálido o azul
2+	50-80	Pequeño	De moderada a fuerte	De incoloro a azul pálido
3+	80-100	De mediano a grande	Fuerte	De incoloro a azul pálido
4+	100	De mediano a grande	Brillante	No es visible

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

** Porcentaje del volumen del citoplasma ocupado por el precipitado de colorante 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 la clasificación celular. Estas cifras se suman para obtener la puntuación LAPA como se muestra en los siguientes ejemplos:

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

Valores esperados

Las siguientes puntuaciones se obtuvieron en Sigma-Aldrich para 20 personas normales. La sangre se extrajo en tubos heparinizados y las láminas se prepararon en una hora.

Fast Blue RR	
LAPA Media ± 1SD	96±44
Intervalo LAPA	52-140

Se obtuvieron los siguientes intervalos de puntuación de esas 20 personas normales:

Fast Blue RR
32-182

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

Observaciones previstas

En los seres humanos, la actividad de la fosfatasa alcalina está restringida a los granulocitos maduros y cayados. Ocasionalmente puede observarse una débil tinción en los linfocitos. Los osteoblastos de la médula ósea y las células endoteliales se tiñen en gran medida.

Se preparó una serie de portaobjetos con sangre obtenida de sujetos normales, mujeres en el último trimestre del embarazo, pacientes en el posparto temprano y personas que presentaban una reacción leucemoide. Los controles negativos se prepararon mediante inactivación por calor, tal como se ha descrito. Se realizaron varias combinaciones de Fast Blue RR y contratincciones (solución de azul de metileno y solución de hematoxilina de Mayer) en repetición y se puntuó el LAPA. Los valores obtenidos en varios portaobjetos preparados en cada sujeto coincidían estrechamente y no parecían estar influidos por la técnica de tinción/contratinción empleada. Por ejemplo, 7 frotis realizados con sangre de una paciente prenatal arrojaron puntuaciones que oscilaban entre 235 y 269, con una media, una desviación estándar y un coeficiente de variación de 255, 11,3 y 4,4 % respectivamente. Los controles negativos revelaron una ausencia total de material teñido.

Características de funcionamiento analítico

Los resultados del funcionamiento analítico de las pruebas realizadas en todas las estructuras objetivo confirman una sensibilidad, especificidad y repetibilidad del 100 %.

N.º de cat.	Descripción del producto	Objetivo	Especificidad intraensayo	Sensibilidad intraensayo	Especificidad interensayo	Sensibilidad interensayo
FBS25	Sal Fast Blue RR	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
855	Solución alcalina de fosfato naftol AS-MX	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
MHS1	Solución de hematoxilina de Mayer	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
854C	Solución de concentrado de citrato	Lugares de actividad	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Advertencias y peligros

Consulte la ficha de seguridad y el etiquetado del producto para obtener información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

85L1:



H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H331 Tóxico en caso de inhalación.

P234 Conservar únicamente en el embalaje original.

P261 Evitar respirar nieblas o vapores.

P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.

P304 + P340 + P311 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P390 Absorber el vertido para prevenir daños materiales.

P403 + P233 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente herméticamente cerrado.

85L2:



H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H331 Tóxico en caso de inhalación.

P234 Conservar únicamente en el embalaje original.

P261 Evitar respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles.

P264 Lavarse cuidadosamente la piel después de la manipulación.

P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.

P304 + P340 + P311 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando.

Si durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se produce un incidente grave, infórmelo al fabricante o a su representante autorizado y a su autoridad nacional.

Definiciones de los símbolos

Símbolos definidos en la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar instrucciones de uso		Código de lote
	Representante autorizado en la Comunidad Europea/Unión Europea		Declaración UE de conformidad (definida en el Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro)
	Fecha de caducidad		Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura		Precaución
	Fecha de fabricación		Importador
	Representante autorizado en Suiza		

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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

Información de contacto

Para hacer un pedido, visite nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para solicitar el Servicio técnico, visite la página de servicio técnico en nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historial de revisiones

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023
Transferido a la nueva plantilla con la marca actual. Especificado para uso profesional en uso previsto y precauciones. Se ha revisado el uso previsto para adaptarlo a las directrices europeas sobre DIV. Se ha actualizado la ficha de datos de seguridad del material a la ficha de datos de seguridad. Se ha actualizado la información de contacto. Se ha eliminado la instrucción de seguir el CLSI para la recogida de muestras. Se ha eliminado la norma EN 980 y se ha cambiado a la norma EN ISO 15223-1:2021 en los símbolos. Se ha añadido la información de contacto en caso de acontecimientos adversos. Se ha eliminado la referencia n.º 4 y se han reenumerado las referencias. Se ha añadido una tabla del historial de revisiones. Se ha añadido una declaración de peligro adicional para el 854C-20ML y el 855-20ML. Se han añadido advertencias y peligros. Información del CH-REP añadida.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

La M inicial y Sigma-Aldrich son marcas comerciales registradas de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania o sus filiales. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños. Puede consultarse la información detallada sobre las marcas comerciales en recursos accesibles al público.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Brugsanvisning

Alkalisk fosfatase-sæt til leukocytter

Procedure nr. 85



Tilsigtet brug

Sigma-Aldrichs alkalisk fosfatase-sæt er beregnet som en histologisk farvning til almindelig laboratoriebrug. Alkalisk fosfatase-reagenser er udelukkende beregnet til professionel "in vitro-diagnostisk brug". Denne manuelle, kvalitative, histokemiske procedure påviser alkalisk fosfatase-aktivitet i leukocytter i blod- eller knoglemarvsfilm fra mennesker. Histologisk visualisering af leukocyt-associeret alkalisk fosfatase er en unik teknik, som aktuelt finder bred anvendelse på det medicinske område.

I 1929 foreslog Kay første gang tilstedeværelsen af alkalisk fosfatase i leukocytter.¹ Først mange år senere introducerede Kaplow dog en praktisk farvningsmetode til påvisning af leukocytenzymet.² Kaplow brugte natrium- α -naphthylfosfat som substrat, Fast Blue RR som diazoniumsalt og anbefalede en scoringsmetode til semikvantitative sammenligninger.² Der blev også foreslået forbedringer, som resulterede i god bevarelse af cellemorfologi. Efterfølgende blev α -naphthylfosfat erstattet af naphthol-AS-fosfat. Det er værd at bemærke, at der er fundet en god korrelation mellem cytokemiske og biokemiske teknikker til analyse af alkalisk fosfataseaktivitet i leukocytter (LAPA).³

Med Sigma-Aldrich-metoden bestemmes alkalisk fosfatase i leukocytter i blod- eller knoglemarvsfilm, efter at de forsigtigt er blevet fikseret på objektglas. De fikserede film inkuberes derefter i en opløsning, der indeholder naphthol-AS-MX-fosfat. Som et resultat af fosfataseaktivitet frigives naphthol-AS-MX og kobles øjeblikkeligt med et diazoniumsalt, hvilket danner et uopløseligt, synligt pigment på steder med fosfataseaktivitet.

Reagenser

Fast Blue RR-salt (kat.nr. FBS25-10CAP)

Fast Blue, CI 37155, forvejede kapsler. Den faktiske vægt pr. kapsel vil variere afhængigt af farvestof-lottet og er blevet optimeret efter analyse.

Alkalisk naphthol-AS-MX-fosfatopløsning (kat.nr. 855-20ML)

Naphthol-AS-MX-fosfat, 0,25 % (vægt/vol.), bufret ved pH 8,6, 25 °C. Fare. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Kan forårsage irritation af luftvejene. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

Mayers hæmatoxylinopløsning (kat.nr. MHS1-100ML)

Hæmatoxylin, certificeret, 1 g/l, CI 75290, natriumiodat, 0,2 g/l, aluminiumammoniumhydroxid, 5 g/l, og stabilisatorer.

Koncentreret citratopløsning (kat.nr. 854C-20ML)

Citronsyre-natriumcitrat, 1,5 mol/l. Fare. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenskade. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Kan forårsage irritation af luftvejene. Bær beskyttelseshandsker/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

Særlige materialer, som er påkrævede, men ikke medfølger

- Scotts postevandserstatningskoncentrat, kat.nr. S5134
- Acetone, ACS-reagens

Opbevaring og stabilitet

Opbevar Fast Blue RR-salt under 0 °C. Opbevar alkalisk naphthol-AS-MX-fosfatopløsning i køleskab (2-8 °C). Reagenserne er stabile indtil udløbsdatoen.

Opbevar Mayers hæmatoxylinopløsning ved stuetemperatur (18-26 °C) beskyttet mod lys. Opløsningen må ikke returneres til den originale beholder efter brug i en Coplin-skål. Skal kasseres, når tiden til passende farvning overstiger den anbefalede tid i proceduren med mere end 5 minutter.

Opbevar koncentreret citratopløsning ved stuetemperatur (18-26 °C). Opbevar citratarbejdsopløsning i køleskab (2-8 °C). Citratopløsninger er egnede til brug ved fravær af mikrobiel vækst.

Forberedelse

Fast Blue RR-salt, alkalisk naphthol-AS-MX-fosfatopløsning og Mayers hæmatoxylinopløsning leveres klar til brug i proceduren.

Fremstil citratarbejdsopløsning ved at fortynde 2 ml citratkoncentratopløsning til 100 ml med demineraliseret vand.

Fremstil fiksativopløsning (citratbufret acetone, 60 %) ved at opvarme citratarbejdsopløsning til stuetemperatur (18-26 °C). Under konstant omrøring tilsættes 2 dele citratarbejdsopløsning til 3 dele acetone. Bortskaf efter brug.

Arbejdsopløsning af Scotts postevandserstatning fremstilles ved at fortynde 1 del Scotts postevandserstatningskoncentrat med 9 dele demineraliseret vand.

Forsigtighedsregler

Disse IVD'er er beregnet til in vitro-diagnostisk brug i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD'er er udelukkende beregnet til professionel brug udført af kvalificeret personale. IVD'er fra Sigma-Aldrich kan benyttes af laboratoriepersonale, som er uddannet til at håndtere potentielt smittefarlige humane prøver, bruge mikroskoper og andet laboratorieudstyr og har en farveopfattelse og synsstyrke, som gør dem i stand til at skelne mellem farver og andre genstande under et mikroskop.

Normale forsigtighedsregler, der iagttages ved håndtering af laboratoriereagenser, skal følges. Bortskaf affald under overholdelse af alle lokale, regionale eller nationale forskrifter.

Procedure

Prøveindsamling

Friske blod- eller knoglemarvsfilm eller prøver, som er antikoaguleret med heparin, kan bruges.⁴ UNDGÅ EDTA.⁴ Blodudstrygninger skal farves for enzymaktivitet inden for 8 timer efter tilberedning. Hvis dette ikke er muligt, kan gradvist tab af alkalisk fosfataseaktivitet dog forsinkes ved fiksering og opbevaring natten over i fryseren.⁴ Film skal tørres mindst 1 time før fiksering og 3 timer efter fiksering inden frykning.

Bemærkninger

Der er mangel på data vedrørende stoffer, der kan interferere med alkalisk fosfatase i leukocytter (LAPA). Visse lægemidler og andre stoffer er kendt for at påvirke cirkulerende alkalisk fosfataseaktivitet.⁵ Orale præventionsmidler, cortisol og stress kan resultere i forhøjede scorer for alkalisk fosfatase i leukocytter.⁶

Udfør proceduren ved brug af positive kontroller. Disse kan fås fra patienter med pyogen leukocytose eller kvinder i tredje trimester af graviditeten eller i løbet af de første flere dage efter fødslen. Scoren for alkalisk fosfatase i leukocytter fra disse personer overstiger normalt 100. En negativ kontrol kan fremstilles ud fra en normal fikseret udstrykning ved at nedsænke den i kogende vand i 1 minut for at inaktivere enzymet. Kontrolfilm kan opbevares i op til 1 år, hvis de opbevares fikseret og indpakket i Parafilm® ved -70 °C. Disse film skal lufttørres mindst 1 time inden fiksering og 3 timer efter fiksering inden frykning.

Det anbefales kraftigt, at hvert laboratorium etablerer sit eget forventede område, der er karakteristisk for den lokale population.

Proceduren afhænger af subjektiv vurdering af farvede celler. Dette kan resultere i en bred variation af opnåede vurderinger. Reaktionsblandingsens temperatur skal holdes mellem 18-26 °C. Lavere temperaturer vil resultere i en væsentligt lavere score. Over 30 °C vil der forekomme markante stigninger i aktiviteten. Eosinofiler farves ikke, men kan genkendes på toflegede kerner og store refraktile granula.

Procedure

1. Hæld 48 ml destilleret vand i en passende beholder, og juster temperaturen til 18-26 °C.
2. Forbered en diazoniumsaltopløsning:
Opløs indholdet af en kapsel med Fast Blue RR-salt i destilleret vand (fra trin 1). En magnetomrører kan være nyttig.
3. Tilsæt 2 ml alkalisk naphthol-AS-MX-fosfatopløsning til fortyndet diazoniumsaltopløsning (fra trin 2). Bland.
4. Bring fiksativopløsningen til stuetemperatur (18-26 °C). Fikser objektglassene ved at nedsænke dem i fiksativopløsning i 30 sekunder. Skyl forsigtigt i demineraliseret vand i 45 sekunder. Lad ikke objektglassene tørre.
5. Anbring objektglassene i den alkaliske farvestofblanding (fra trin 3), og inkuber ved 18-26 °C i 30 minutter. Beskyt de nedsænkede objektglas mod direkte lys. Bortskaf den alkaliske farvestofblanding efter brug.
6. Efter 30 minutter fjernes objektglassene og skylles grundigt i demineraliseret vand i 2 minutter. Lad ikke objektglassene tørre.
7. Anbring objektglassene i Mayers hæmatoxylinopløsning i 10 minutter.
8. Skyl de kontrastfarvede objektglas i 3 minutter i demineraliseret vand. Dette vil resultere i rødviollet nuklear farvning.
9. Evaluer mikroskopisk. Brug udelukkende vandige monteringsmedier, hvis dækglasser er påkrævet.

Præstationskarakteristika

Scoringsmetode

Scan filmen (900X), og vælg et tyndt område, hvor erythrocytterne næsten ikke rører hinanden. Steder med fosfataseaktivitet vil fremstå som blå granula. Vælg 100 på hinanden følgende segmenterede og båndformede neutrofile granulocytter. Klassificer fra 0 til 4+ på basis af mængden og intensiteten af udfældet farvestof i cytoplasmaet i disse celler. Se tabel 1 vedrørende karakteristika for scoring. Summen af klassificeringen af 100 celler betragtes som scoren.

Tabel 1. Karakteristika for scoring*

Udfældet azofarvestof i cytoplasma				
Celleklas-sificering	Mængde** (%)	Granulum-størrelse	Farvningsintensitet	Baggrund for cytoplasma
0+	Ingen	-	Ingen	Ingen
1+	50	Lille	Svag til moderat	Farveløs til meget blegt blå
2+	50-80	Lille	Moderat til kraftig	Farveløs til blegt blå
3+	80-100	Mellem til stor	Kraftig	Farveløs til blå
4+	100	Mellem til stor	Strålende	Ikke synlig

* Tabel 1 repræsenterer ændring af observationer foretaget af Kaplow.^{2,3}

** Procent af cytoplasmavolumen, der er optaget af azofarveudfældning.

Scoren for alkalisk fosfataseaktivitet i leukocytter (LAPA) opnås ved at multiplicere antallet af talte celler med værdien for celleklassificering. Disse tal lægges sammen for at opnå LAPA-scoren som vist i følgende eksempler:

Celleklassificering	Optalt score	LAPA-score
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
I alt	100	67

Forventede værdier

Følgende scorer blev opnået hos Sigma-Aldrich for 20 normale personer. Blod blev udtaget i hepariniserede rør, og film blev fremstillet inden for en time.

Fast Blue RR	
LAPA-middelværdi ±1 SD	96±44
LAPA-område	52-140

Følgende scoringsområder blev opnået fra disse 20 normale personer:

Fast Blue RR
32-182

Kontakt Sigma-Aldrich teknisk service for at få assistance, hvis de observerede resultater afviger fra de forventede resultater.

Forventede observationer

Hos mennesker er alkalisk fosfataseaktivitet begrænset til modne og båndformede granulocytter. Der kan lejlighedsvist observeres svag farvning i lymfocytter. Knoglemarvs-osteoblaster og endotelceller farves kraftigt.

En række objektglas blev fremstillet under anvendelse af blod opnået fra normale forsøgspersoner, kvinder i sidste trimester af graviditeten, tidlige postpartumpatienter og personer, der udviste en leukæmoid reaktion. Negative kontroller blev fremstillet ved varmeinaktivering som beskrevet. Forskellige kombinationer af Fast Blue RR- og kontrastfarvninger (methylenblåt-opløsning og Mayers hæmatoxylinopløsning) blev udført i replikat og LAPA-scoret. Værdier opnået på flere objektglas, som blev fremstillet for hver forsøgsperson, stemte nøje overens og syntes ikke at være påvirket af den anvendte farvnings-/kontrastfarvningsteknik. For eksempel gav 7 udstrygninger, som blev foretaget med blod fra en prænatal patient, scorer fra 235-269 med en gennemsnitlig standardafvigelse og variationskoefficient på henholdsvis 255, 11,3 og 4,4 %. Negative kontroller afslørede et fuldstændigt fravær af farvet materiale.

Analytiske præstationskarakteristika

Resultaterne for analyseydelsen for de givne tests, som blev udført på alle målstrukturer, bekræfter 100 % sensitivitet, specificitet og repeterbarhed.

Kat. nr.	Produktbeskrivelse	Mål	Specificitet inden for analyse	Sensitivitet inden for analyse	Specificitet mellem analyser	Sensitivitet mellem analyser
FBS25	Fast Blue RR-salt	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
855	Alkalisk naphthol-AS-MX-fosfatopløsning	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
MHS1	Mayers hæmatoxylinopløsning	Kerner	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
854C	Koncentreret citra-topløsning	Aktivitets-steder	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3

Advarsler og farer

Se sikkerhedsdatabladet og produktmærkningen vedrørende opdaterede risiko-, fare- eller sikkerhedsoplysninger.

85L1:



H290 Kan ætse metaller.

H331 Giftig ved indånding.

P234 Opbevares kun i originalemballagen.

P261 Undgå indånding af tåge eller dampe.

P271 Brug kun udendørs eller i et rum med god udluftning.

P304 + P340 + P311 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes. Ring til en GIFTINFORMATION/læge.

P390 Absorber udslip for at undgå materielskade.

P403 + P233 Opbevares på et godt ventileret sted. Hold beholderen tæt lukket.

85L2:



H290 Kan ætse metaller.

H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.

H331 Giftig ved indånding.

P234 Opbevares kun i originalemballagen.

P261 Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.

P264 Vask huden grundigt efter brug.

P271 Brug kun udendørs eller i et rum med god udluftning.

P304 + P340 + P311 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes. Ring til en GIFTINFORMATION/læge.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

Hvis der er opstået en alvorlig hændelse under brugen af dette produkt eller som følge af dets brug, skal det indberettes til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og til den nationale myndighed i brugerens land.

Symboldefinitioner

Symboler som defineret i EN ISO 15223-1:2021

	Producent		Katalognummer
	Se brugsanvisningen		Batchkode
	Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/ Den Europæiske Union		Den Europæiske Unions overensstemmelseserklæring (defineret i IVDR 2017/746)
	Sidste anvendelsesdato		Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Temperaturgrænse		Forsigtig
	Fremstillingsdato		Importør
	Angiver autoriseret repræsentant i Schweiz		

Referencer

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Kontaktoplysninger

Besøg vores websted på SigmaAldrich.com for at afgive en bestilling. Gå til siden for teknisk service på vores websted på SigmaAldrich.com/techservice for at få oplysninger om teknisk service.

Revisionshistorik

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Overført til ny skabelon med nuværende branding. Specificeret til professionel brug under tilsigtet brug og forsigtighedsregler. Revideret tilsigtet brug for at tilpasse til IVDR-retningslinjer. Opdateret materialesikkerhedsdatablad til sikkerhedsdatablad. Opdateret kontaktoplysninger. Fjernet instruks om at følge CLSI vedrørende prøveindsamling. Fjernet EN 980 og ændret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. Tilføjet kontaktoplysninger i tilfælde af uønskede hændelser. Fjernet reference nr. 4 og omnummereret referencerne. Tilføjet en revisionshistoriktabel. Tilføjet yderligere fareerklæring for 854C-20ML og 855-20ML. Tilføjet advarsler og farer. Tilføjet information om repræsentant i Schweiz.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Forbogstavet M og Sigma-Aldrich er varemærker tilhørende Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland, eller deres tilknyttede virksomheder. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere. Detaljerede oplysninger om varemærker kan indhentes via offentligt tilgængelige ressourcer.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Bruksanvisning

Leukocyt-alkalisk fosfatas-sats

Förfarande nr. 85



Avsedd användning

Sigma-Aldrich alkaliska fosfatas-satser är avsedda som histologisk färgning för allmän laboratorieanvändning. Alkaliska fosfatas-reagenser är endast avsedda för professionell "in vitro-diagnostisk användning". Det här manuella, kvalitativa och histokemiska förfarandet påvisar alkalisk fosfatas-aktivitet i leukocyter i blod- eller benmärgsfilmer från människor. Histologisk visualisering av leukocyt associerad med alkalisk fosfatas är en unik teknik som för närvarande ofta används inom medicinska områden.

Kay föreslog först närvaron av alkalisk fosfatas i leukocyter år 1929.¹ Men det var inte förrän många år senare som Kaplow introducerade en praktisk färgningsmetod för att påvisa leukocytenzymer.² Kaplow använde natrium- α -naftylfosfat som substrat, fast blå RR som diazoniumsalt och rekommenderade en värdesättningsmetod för semikvantitativa jämförelser.² Även förbättringar som ledde till god bevaring av cellmorfologi föreslogs. Därefter ersattes α -naftylfosfat med naftol-AS-fosfat. Det är värt att nämna att en god korrelation mellan cytokemiska och biokemiska tekniker för analys av aktivitet av alkalisk fosfatas i leukocyter (LAPA) har hittats.³

Med Sigma-Aldrich-metoden påvisas alkalisk fosfatas i leukocyter i blod- och benmärgsfilmer efter att de försiktigt fixerats på objektglas. De fixerade filmerna inkuberas sen i en lösning med naftol-AS-MX-fosfatas. Som ett resultat av fosfatasaktivitet frigörs naftol-AS-MX och sammankopplas direkt med ett diazoniumsalt, vilket bildar ett olösligt, synligt pigment på platser med fosfatasaktivitet.

Reagenser

Fast Blue RR-salt (kat.-nr. FBS25-10CAP)
Fast Blue, C.I. 37155, färväga kapslar. Faktisk vikt per kapsel varierar per färgämnesparti och har optimerats genom analys.

Naftol-AS-MX-fosfat alkalisk lösning (kat.-nr. 855-20ML)
Naftol-AS-MX-fosfat, 0,25 % (vikt/volym), buffrad vid pH 8,6, 25 °C. Fara. Orsakar hudirritation. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan orsaka irritation i luftvägarna. Andas inte in damm/rök/gas/dimma/ångor/spray. VID SVÄLJNING: Ring omedelbart till GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.

Mayers hematoxylinlösning (kat.-nr. MHS1-100ML)
Hematoxylin (certifierad), 1 g/l, C.I. 75290, natriumjodat, 0,2 g/l, aluminiumammoniumsulfat, 5 g/l, och stabiliseringsmedel

Citratkoncentrerad lösning (kat.-nr. 854C-20ML)
Citronsyra-natriumcitrat, 1,5 mol/l. Fara. Orsakar hudirritation. Orsakar allvarliga ögonskador. Andas inte in damm/rök/gas/dimma/ångor/spray. Kan orsaka irritation i luftvägarna. Använd skyddshandskar/skyddsglasögon/ansiktsskydd.

Särskilt materiel som krävs men inte tillhandahålls

- Scotts kranvattensättning, koncentrat, kat.-nr. S5134
- Aceton, ACS-reagens

Förvaring och hållbarhet

Förvara Fast Blue RR-salt under 0 °C. Förvara naftol-AS-MX-fosfat alkalisk lösning i kylskåp (2–8 °C). Reagensen är stabil fram till utgångsdatumet.

Förvara Mayers hematoxylinlösning tätt tillsluten i rumstemperatur (18–26 °C) skyddad från ljus. Håll inte tillbaka lösningen i den ursprungliga behållaren efter användning i Coplin-burk. Kassera när tiden som krävs för lämplig färgning överskrider den tid som rekommenderas i förfarandet med mer än 5 minuter.

Förvara citratkoncentrerad lösning i rumstemperatur (18–26 °C). Förvara verksam citratlösning i kylskåp (2–8 °C). Citratlösningar är lämpliga för användning i frånvaro av mikrobiell tillväxt.

Beredning

Fast Blue RR-salt, naftol-AS-MX-fosfat alkalisk lösning och Mayers hematoxylinlösning tillhandahålls klara att använda i förfarandet.

Bered verksam citratlösning genom att späda ut 2 ml citratkoncentratlösning i 100 ml avjoniserat vatten.

För att bereda fixeringslösning (citratbuffrad aceton, 60 %) ska du värma verksam citratlösning i rumstemperatur (18–26 °C). Under konstant omrörning ska du lägga till 2 volymer verksam citratlösning i 3 volymer aceton. Kassera efter användning.

Verksam lösning av Scotts kranvattensättning bereds genom att späda 1 del Scotts kranvattensättningskoncentrat med 9 delar avjoniserat vatten.

Försiktighetsåtgärder

Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är avsedda att användas i klinisk laboratoriemiljö. Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är endast avsedda att användas av kvalificerad personal. Medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik från Sigma-Aldrich får användas av laboratoriepersonal som är utbildad i hantering av humanprover som kan vara smittsamma, användning av mikroskop och annan laboratorieutrustning samt har tillräckligt bra färgseende och synskärpa för att kunna urskilja färger och andra föremål under mikroskop.

Följ sedvanliga försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser. Kassera avfall i enlighet med alla lokala, statliga, regionala och nationella bestämmelser.

Förfarande

Provtagning

Nytagna blod- eller benmärgsfilmer eller prover som antikoagulerats med heparin kan användas.⁴ UNDIK EDTA.⁴ Blodutstryk bör färgas för enzymaktivitet inom 8 timmar efter preparering. Om detta inte är möjligt kan gradvis förlust av aktivitet av alkalisk fosfatas fördröjas genom fixering och förvaring över natten i frys.⁴ Filmer bör torka minst en timme före fixering och 3 timmar efter fixering innan de fryses.

Anmärkningar

Det finns brist på data gällande föreningar som kan störa aktiviteten av alkaliskt fosfatas i leukocyter (LAPA). Vissa läkemedel och andra substanser är kända för att påverka aktiviteten av cirkulerad alkalisk fosfatas.⁵ Orala preventivmedel, kortisol och stress kan resultera i förhöjda värden av alkalisk fosfatas i leukocyter.⁶

Utför förfarandet med positiva kontroller. Dessa kan samlas från patienter med pyrogenisk leukocytos och kvinnor i graviditetens tredje trimester eller under de första dagarna efter förlösningen. Värden för alkalisk fosfatas i leukocyter från dessa personer är vanligtvis över 100. En negativ kontroll kan prepareras från ett normalt fixerat utstryk genom att sänka ned det i kokande vatten i 1 minut för att avaktivera enzymet. Kontrollfilmer kan bevaras i upp till 1 år om de förvaras fixerade, inlindade i Parafilm® vid –70 °C. Dessa filmer bör lufttorka minst 1 timme före fixering och 3 timmar efter fixering innan de fryses.

Det rekommenderas starkt att varje labb etablerar sin egen förväntade intervall, karakteristisk för den lokala befolkningen.

Förfarandet är beroende av subjektiv bedömning av färgade celler. Detta kan resultera i stor variation bland de bedömningar som görs. Temperaturen på reaktionsblandningen måste hållas mellan 18–26 °C. Lägre temperaturer kommer leda till väsentligt lägre värden. Över 30 °C kommer en markant ökning i aktivitet att ske. Eosinofiler färgas inte men kan kännas igen på sina tvåflikiga kärnor och stora refraktila granula.

Förfarande

1. Mät upp 48 ml destillerat vatten i en lämplig behållare och justera temperaturen till 18–26 °C.
2. Bered diazoniumsaltlösning:
Lös upp innehållet i en Fast Blue RR-saltkapsel i destillerat vatten (från steg 1). En magnetisk omrörare kan vara hjälpsam.
3. Lägg till 2 ml naftol-AS-MX-fosfat alkalisk lösning i utspädd diazoniumsaltlösning (från steg 2). Blanda.
4. Låt fixeringslösningen få rumstemperatur (18–26 °C). Fixera objektglaset genom att doppa i fixeringslösning i 30 sekunder. Skölj försiktigt i avjoniserat vatten i 45 sekunder. Låt inte objektglaset torka.
5. Lägg till objektglas till den alkaliska färgämnesblandningen (från steg 3) och inkubera vid 18–26 °C i 30 minuter. Skydda nedsänkta objektglas från direkt ljus. Kassera alkalisk färgämnesblandning efter användning.
6. Efter 30 minuter ska du ta ut objektglaset och skölja ordentligt i avjoniserat vatten i 2 minuter. Låt inte objektglaset torka.
7. Placera objektglas i Mayers hematoxylinlösning i 10 minuter.
8. Skölj motfärgade objektglas i 3 minuter i avjoniserat vatten. Detta kommer leda till en röd-lila kärnfärgning.
9. Utvärdera mikroskopiskt. Om täckglas behövs ska endast ett vattenbaserat monteringsmedium användas.

Prestandaegenskaper

Värderingsmetod

Skanna filmen (900X) och välj ett tunt område där erythrocyter knappt rör varandra. Ställen med fosfatasaktivitet kommer synas som blå granula. Välj 100 segmentella och bandformiga neutrofila granulocyter i följd. Bedöm från 0 till 4+ baserat på kvantitet och intensitet av utfällt färgämne inom cellernas cytoplasma. För egenskaper för värdebestämmande ska du se tabell 1. Summan av bedömningarna från 100 celler anses vara värdet.

Tabell 1. Egenskaper för värdebestämmande*

Utfällt azofärgämne i cytoplasma				Bakgrund av cytoplasma
Cell-bedömning	Mängd** (%)	Storlek på granula	Färgnings-intensitet	
0+	Ingen	-	Ingen	Ingen
1+	50	Liten	Svag till medel	Färglös till mycket blekt blå
2+	50–80	Liten	Medel till stark	Färglös till blekt blå
3+	80–100	Medium till stor	Stark	Färglös till blå
4+	100	Medium till stor	Mycket stark	Ej synlig

* Tabell 1 visar modifieringar av observationer gjorda av Kaplow.^{2,3}
** Procent av volymen cytoplasma som upptas av azofärgämnesutfällning.

För att få ett värde för alkalisk fosfatasaktivitet i leukocyter (LAPA) multipliceras det räknade antalet celler med värdet för cellbedömning. Dessa siffror läggs till för att få LAPA-värdet som visas i följande exempel:

Cellbedömning	Räknat värde	LAPA-värde
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totalt	100	67

Förväntade värden

Följande värden togs fram på Sigma-Aldrich för 20 normala individer. Blod samlades in i hepariniserade provrör och filmer bereddes inom en timme.

Fast Blue RR	
LAPA Medelvärde $\pm$ 1SD	96 $\pm$ 44
LAPA-intervall	52–140

Följande värden erhöles från de 20 normala individerna:

Fast Blue RR
32–182

Kontakta teknisk service på Sigma-Aldrich för hjälp ifall resultaten som observeras avviker från de förväntade resultaten.

Förväntade observationer

Hos människor är alkaliskt fosfatasaktivitet begränsad till mogna och bandformiga granulocyter. Sporadisk svag färgning kan observeras i lymfocyter. Benmärgsosteoblaster och endotelceller färgas starkt.

En serie objektglas bereddes med blod som samlats in från normala forskningspersoner, kvinnor i graviditetens tredje trimester, nyligen förlösta patienter, och individer som uppvisade leukemoid reaktion. Negativa kontroller bereddes genom värmeavaktivering som beskrivet. Olika kombinationer av Fast Blue RR och motfärgning (metylenblått-lösning och Mayers hematoxylinlösning) utfördes i replikat och LAPA bedömdes. Värderna som erhöles från flera objektglas som bereddes från varje forskningsperson var nära överensstämmande och verkar inte ha påverkats av färgnings-/motfärgningstekniken som använts. Till exempel gav sju utstryk med blod från en prenatal patient värden från 235–269 med medelvärde, standardavvikelse och variationskoefficient på respektive 255, 11,3 och 4,4 %. Negativa kontroller visade en fullständig avsaknad av färgat material.

Analytiska prestandaegenskaper

De analytiska prestandaresultaten för de givna testerna utförda på alla målstrukturer bekräftar 100 % sensitivitet, specificitet och repeterbarhet.

Kat.-nr.	Produktbeskrivning	Mål	Specificitet inom analys	Sensitivitet inom analys	Specificitet mellan analyser	Sensitivitet mellan analyser
FBS25	Fast Blue RR-salt	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
855	Naftol-AS-MX-fosfat alkalisk lösning	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
MHS1	Mayers hematoxylinlösning	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
854C	Citratkoncentrerad lösning	Aktivitets-ställen	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Varningar och faror

Se säkerhetsdatabladet och produktmärkningen för uppdaterad information om risker, fara och säkerhet.

85L1:



H290 Kan vara frätande på metaller.

H331 Giftigt vid inandning.

P234 Förvara endast i originalförpackningen.

P261 Undvik att andas in dimma eller ångor.

P271 Använd endast utomhus eller i ett välventilerat utrymme.

P304 + P340 + P311 VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att personen andas utan problem. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P390 Sug upp spill för att undvika materiella skador.

P403 + P233 Förvara på en väl ventilerad plats. Håll behållaren tätt försluten.

85L2:



H290 Kan vara frätande på metaller.

H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.

H331 Giftigt vid inandning.

P234 Förvara endast i originalförpackningen.

P261 Andas inte in damm/rök/gas/dimma/ångor/spray.

P264 Tvätta huden noggrant efter hantering.

P271 Använd endast utomhus eller i ett välventilerat utrymme.

P304 + P340 + P311 VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att personen andas bekvämt. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P305 + P351 + P338 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

Om det har inträffat ett allvarligt tillbud medan denna enhet använts eller som ett resultat av att den har använts ska det rapporteras till tillverkaren och/eller dess auktoriserade representant samt myndigheten i ditt land.

Symbolförklaring

Symboler enligt definition i EN ISO 15223-1:2021

	Tillverkare		Katalognummer
	Se bruksanvisningen		Batchkod
	Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen/ Europeiska unionen		EU-försäkran om överensstämmelse (definieras i IVDR 2017/746)
	Utgångsdatum		Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	Temperaturgräns		Försiktighet
	Tillverkningsdatum		Importör
	Anger den auktoriserade representanten i Schweiz		

Referenser

- 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
- Proposed Standard: Histochemical Method for Leukocyte Alkaline Phosphatase H22-P, Vol 4, Nr. 14, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, sid. 248–250

Kontaktuppgifter

För att göra en beställning besöker du vår webbplats på [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). För teknisk service besöker du sidan för teknisk service på vår webbplats [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorik

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Överfört till ny mall med nuvarande varumärke. Specificerat "För yrkesmässigt bruk" under "Avsedd användning" och under "Försiktighetsåtgärder". Reviderat "Avsedd användning" så att det motsvarar riktlinjerna för IVDR. Uppdaterat "Materialsäkerhetsdatablad" till "Säkerhetsdatablad". Uppdaterat kontaktuppgifterna. Tagit bort anvisningen om att CLSI ska följas vid provtagning. Tagit bort EN 980 och ändrat till EN ISO 15223-1:2021 för symbolerna. Lagt till kontaktuppgifter för negativa händelser. Tagit bort referens nummer fyra och gjort om numrering av referenser. Lagt till en tabell över revisionshistoriken. Lagt till ytterligare angivelse om fara för 854C-20ML och 855-20ML. Lagt till varningar och faror. Lagt till information om representant i Schweiz.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M och Sigma-Aldrich är varumärken som tillhör Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dess dotterbolag. Övriga varumärken tillhör respektive ägare. Detaljerad information om varumärken finns tillgänglig via allmänt tillgängliga resurser.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Instruções de utilização

Kit de Fosfatase alcalina de leucócitos

Procedimento N.º 85



Utilização prevista

Os kits de fosfatase alcalina da Sigma-Aldrich destinam-se a ser utilizados como corantes histológicos para uso geral em laboratório. Os reagentes de fosfatase alcalina destinam-se somente a "Utilização para diagnóstico in vitro" por profissionais. Este procedimento histoquímico, qualitativo e manual, destina-se a demonstrar atividade de fosfatase alcalina em leucócitos de sangue humano ou películas de medula óssea. A visualização histológica da fosfatase alcalina leucocitária é uma técnica única atualmente utilizada em medicina.

Em 1929, Kay sugeriu pela primeira vez a presença da fosfatase alcalina em leucócitos.¹ Contudo, só muitos anos mais tarde é que Kaplow introduziu um método prático de coloração para demonstrar a enzima leucocitária.² Kaplow utilizou fosfato de o-naftil de sódio como substrato, azul rápido RR como sal diazônico e recomendou um método de classificação para comparações semiquantitativas.² Foram também sugeridas melhorias que resultaram numa boa preservação da morfologia celular. Posteriormente, o fosfato de o-naftil foi substituído pelo fosfato de naftol AS. De salientar que foi encontrada uma boa correlação entre as técnicas citoquímicas e bioquímicas para a realização de ensaios sobre a atividade da fosfatase alcalina leucocitária (LAPA).³

Com o método da Sigma-Aldrich, a fosfatase alcalina leucocitária é determinada em películas de sangue ou medula óssea depois de serem gentilmente fixados nas lâminas. As películas fixadas são então incubadas numa solução contendo fosfato de naftol AS-MX. Como resultado da atividade da fosfatase, o naftol AS-MX é libertado e imediatamente associado a um sal de diazônio, formando um pigmento insolúvel e visível nos locais de atividade da fosfatase.

Reagentes

Sal azul rápido RR (Cat. N.º FBS25-10CAP)

Azul rápido, C.I. 37155, Cápsulas pré-pesadas. O peso real por cápsula varia de acordo com o lote do corante e foi otimizado por ensaio.

Solução alcalina de Fosfato de naftol AS-MX (N.º de cat. 855-20ML)

Fosfato de naftol AS-MX, 0,25% (p/v), tamponado a pH 8,6, 25 °C. Perigo. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. EM CASO DE INGESTÃO: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Solução de Hematoxilina de Mayer (Cat. N.º MHS1-100ML)

Hematoxilina, certificada, 1 g/l, C.I. 75290, iodato de sódio, 0,2 g/l, hidróxido de alumínio-amônio, 5 g/l, e estabilizadores

Solução concentrada de Citrato (Cat. N.º 854C-20ML)

Ácido cítrico-citrato de sódio, 1,5 mol/l. Perigo. Provoca irritação cutânea. Provoca lesões oculares graves. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Materiais especiais necessários mas não fornecidos

- Concentrado de substituto de água da torneira Scott, N.º de cat. S5134
- Acetona, Reagente ACS

Conservação e estabilidade

Conservar o Sal azul rápido RR a uma temperatura inferior a 0 °C. Conservar a Solução alcalina de fosfato de naftol AS-MX no frigorífico (2-8 °C). Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade.

Conservar a Solução de Hematoxilina de Mayer firmemente tapada à temperatura ambiente (18-26 °C) e protegida da luz. Não colocar a solução novamente no recipiente original após a utilização numa jarra de Coplin. Eliminar quando o tempo necessário para obter uma coloração adequada exceder o tempo recomendado no procedimento em mais de 5 minutos.

Conservar a Solução concentrada de citrato à temperatura ambiente (18-26 °C). Conservar a Solução de trabalho de citrato no frigorífico (2-8 °C). As soluções de citrato são adequadas para uso na ausência de crescimento microbiano.

Preparação

O Sal azul rápido RR, a Solução alcalina de Fosfato de naftol AS-MX e a Solução de Hematoxilina de Mayer são fornecidos prontos a utilizar no procedimento.

Preparar a Solução de trabalho de Citrato diluindo 2 ml de Solução concentrada de Citrato em 100 ml de água desionizada.

Para preparar a Solução fixadora (acetona tamponada de citrato, 60%), Solução de trabalho de Citrato quente à temperatura ambiente (18-26 °C). Com agitação constante, adicionar 2 volumes de Solução de trabalho de Citrato a 3 volumes de acetona. Eliminar após a utilização.

A Solução de trabalho do Substituto de água da torneira Scott é preparada diluindo 1 volume de Concentrado de substituto de água da torneira Scott em 9 volumes de água desionizada.

Precauções

Estes DIV destinam-se a utilização para diagnóstico in vitro num ambiente de laboratório clínico. Estes DIV destinam-se apenas a utilização profissional por pessoal qualificado. Os DIV da Sigma-Aldrich podem ser utilizados por técnicos de laboratório com formação no manuseamento de amostras humanas potencialmente infecciosas e na utilização de microscópios e outros equipamentos laboratoriais e com perceção cromática e acuidade visual para distinguir cores e outros objetos ao microscópio.

Devem seguir-se as precauções normais no manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos cumprindo todos os regulamentos locais, estatais, municipais ou nacionais.

Procedimento

Colheita de amostras

Pode utilizar películas de sangue fresco ou medula óssea ou amostras anticoaguladas com heparina.⁴ EVITAR UTILIZAR EDTA.⁴ Os esfregaços de sangue devem ser corados para detetar a atividade enzimática dentro de 8 horas após a preparação. No entanto, se tal não for possível, a perda gradual da atividade da fosfatase alcalina pode ser retardada por fixação e conservação durante a noite no congelador.⁴ As películas devem ser secas durante, pelo menos, 1 hora antes da fixação e 3 horas após a fixação antes do congelamento.

Notas

Há uma escassez de dados relativos a compostos que possam interferir com a atividade da fosfatase alcalina leucocitária (LAPA). Sabe-se que determinados fármacos e outras substâncias influenciam a atividade da fosfatase alcalina em circulação.⁵ Os contraceptivos orais, o cortisol e o stress podem resultar em classificações elevadas de fosfatase alcalina leucocitária.⁶

Realizar o procedimento utilizando controlos positivos. Estes podem ser obtidos através de doentes com leucocitose piogénica, ou de mulheres no terceiro trimestre de gravidez ou durante os primeiros vários dias pós-parto. Geralmente, as classificações de fosfatase alcalina leucocitária destes doentes excedem 100. É possível preparar um controlo negativo a partir de um esfregaço normal fixado, submergindo-o em água a ferver durante 1 minuto para inativar a enzima. É possível conservar as películas de controlo até 1 ano se forem conservadas fixadas, envoltas em Parafilm® a -70 °C. Estas películas devem ser secas ao ar, pelo menos, 1 hora antes da fixação e 3 horas após a fixação antes do congelamento.

Recomenda-se vivamente que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo esperado, característico da população local.

O procedimento depende da classificação subjetiva das células coradas. Isto pode resultar numa ampla variação das classificações obtidas. A temperatura da mistura de reação deve ser mantida entre 18-26 °C. Temperaturas mais baixas resultam em classificações significativamente mais baixas. Acima de 30 °C, ocorrem aumentos acentuados de atividade. Os eosinófilos não coram mas podem ser reconhecidos por núcleos bilobados e grânulos refratários grandes.

Procedimento

- Medir 48 ml de água destilada para um recipiente adequado e ajustar a temperatura para 18-26 °C.
- Preparar a Solução de Sal de diazônio: Dissolver o conteúdo de uma cápsula de Sal azul rápido RR em água destilada (a partir do Passo 1). Um agitador magnético pode ser útil.
- Adicionar 2 ml de Solução alcalina de Fosfato de naftol AS-MX à Solução de Sal de diazônio diluída (Passo 2). Misture.
- Levar a Solução fixadora à temperatura ambiente (18-26 °C). Fixar as lâminas submergindo-as em Solução fixadora durante 30 segundos. Enxaguar suavemente em água desionizada durante 45 segundos. Não permitir que as lâminas sequem.
- Adicionar lâminas à mistura alcalino-corante (Passo 3) e incubar a 18-26 °C durante 30 minutos. Proteger as lâminas imersas da luz direta. Eliminar mistura alcalino-corante após a utilização.
- Após 30 minutos, remover as lâminas e enxaguar cuidadosamente em água desionizada durante 2 minutos. Não permitir que as lâminas sequem.
- Colocar as lâminas na Solução de Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos.
- Enxaguar as lâminas sujeitas a contracoloração, durante 3 minutos, em água desionizada. Isto resultará numa coloração nuclear vermelho-violeta.
- Avaliar microscopicamente. Se for necessário utilizar lamelas, utilizar apenas um meio de montagem aquoso.

Características do desempenho

Método de classificação

Digitalizar a película (900X) e selecionar uma área fina onde os eritrócitos mal se toquem. Os locais de atividade da fosfatase surgem como grânulos azuis. Selecionar 100 granulócitos neutrofílicos segmentados e em forma banda consecutivos. Classificar de 0 a 4+ com base na quantidade e intensidade do corante precipitado no citoplasma destas células. Consultar a Tabela 1 para obter as características da classificação. A soma das classificações de 100 células é considerada como a pontuação.

Tabela 1. Características da classificação*

Corante azo precipitado no citoplasma				
Classificação das células	Quantidade** (%)	Tamanho do grânulo	Intensidade da coloração	Fundo do citoplasma
0+	Nenhum/a	-	Nenhum/a	Nenhum/a
1+	50	Pequeno	Ténue a moderada	Incolor a azul muito claro
2+	50-80	Pequeno	Moderada a forte	Incolor a azul claro
3+	80-100	Médio a grande	Forte	Incolor a azul
4+	100	Médio a grande	Brilhante	Não visível

* A Tabela 1 representa a modificação das observações feitas por Kaplow.^{2,3}

** Percentagem do volume de citoplasma ocupado pelo corante azo precipitado.

Para obter a pontuação da atividade da fosfatase alcalina leucocitária (LAPA), o número de células contadas é multiplicado pelo valor da classificação das células. Estes valores são adicionados para obter a classificação da LAPA, conforme apresentado nos seguintes exemplos:

Classificação das células	Classificação contada	Classificação da LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Total	100	67

Valores esperados

As seguintes classificações foram obtidas na Sigma-Aldrich para 20 indivíduos normais. O sangue foi recolhido para dentro de tubos heparinizados e foram preparadas películas dentro de uma hora.

Azul rápido RR	
Média da LAPA ± 1SD	96±44
Intervalo da LAPA	52-140

O seguinte intervalo de classificações foi obtido através desses 20 indivíduos normais:

Azul rápido RR
32-182

Se os resultados observados variarem dos resultados previstos, contacte a Assistência técnica da Sigma-Aldrich para obter ajuda.

Observações esperadas

Nos seres humanos, a atividade da fosfatase alcalina restringe-se aos granulócitos maduros e em forma de banda. Ocasionalmente, pode observar-se uma coloração fraca nos linfócitos. Os osteoblastos de medula óssea e as células endoteliais coram fortemente.

Uma série de lâminas foi preparada utilizando sangue obtido de sujeitos normais, mulheres no último trimestre de gravidez, doentes pós-parto precoces e indivíduos que exibiam uma reação leucemóide. Os controlos negativos foram preparados por inativação por calor, conforme descrito. Várias combinações de Azul rápido RR e contracolorações (Solução de Azul de metileno e Solução de Hematoxilina de Mayer) foram realizadas em réplica e o LAPA classificou. Os valores obtidos em várias lâminas preparadas sobre cada indivíduo estavam em estreita concordância e não pareciam influenciados pela técnica de coloração/contracoloração utilizada. Por exemplo, 7 esfregaços feitos com sangue de uma doente pré-natal produziram resultados entre 235 a 269 com uma média, desvio padrão e coeficiente de variação de 255, 11,3 e 4,4% respetivamente. Os controlos negativos revelaram uma ausência completa de material corado.

Características do desempenho analítico

Os resultados do desempenho analítico para os testes indicados realizados em todas as estruturas alvo, confirmam uma sensibilidade de 100%, especificidade e repetibilidade.

N.º de cat.	Descrição do produto	Alvo	Especificidade intraensaio	Sensibilidade intraensaio	Especificidade interensaio	Sensibilidade interensaio
FBS25	Sal azul rápido RR	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
855	Solução alcalina de Fosfato de naftol AS-MX	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
MHS1	Solução de hematoxilina de Mayer	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
854C	Solução concentrada de Citrato	Locais de atividade	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Avisos e Perigos

Consulte a Folha de Dados de Segurança e a rotulagem do produto para obter informações atualizadas sobre riscos, perigos ou segurança.

85L1:



H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H331 Tóxico por inalação.

P234 Mantenha sempre o produto na sua embalagem original.

P261 Evitar respirar as névoas ou vapores.

P271 Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.

P304 + P340 + P311 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P390 Absorver o produto derramado a fim de evitar danos materiais.

P403 + P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.

85L2:



H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H319 Provoca irritação ocular grave.

H331 Tóxico por inalação.

P234 Mantenha sempre o produto na sua embalagem original.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 Lavar a pele cuidadosamente após manuseamento.

P271 Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.

P304 + P340 + P311 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cautelosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Caso tenha ocorrido algum incidente grave durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, comunique-o ao fabricante e/ou ao respetivo representante autorizado e à sua autoridade nacional.

Definições dos símbolos

Símbolos conforme definidos na norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar as instruções de utilização		Código do lote
	Representante autorizado na Comunidade Europeia/ União Europeia		Declaração de Conformidade da União Europeia (definida na diretiva RDIV 2017/746)
	Data de validade		Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Limite de temperatura		Atenção
	Data de fabrico		Importador
	Indica o Representante Autorizado na Suíça		

Referências

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

Informações de contacto

Para encomendar, visite o nosso site em SigmaAldrich.com. Para Assistência técnica, visite a página de assistência técnica no nosso site SigmaAldrich.com/techservice.

Histórico de revisões

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023
Transferência para novo modelo com a marca atual. Especificação para utilização profissional na utilização prevista e nas precauções. Revisão da utilização prevista para alinhamento com as diretrizes do regulamento relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro (RDIV). Atualização de Folha de Dados de Segurança do Material para Folha de Dados de Segurança. Atualização das informações de contacto. Remoção da instrução para seguir o CLSI na colheita de amostras. Remoção da norma EN 980 e alteração para a norma EN ISO 15223-1:2021 nos símbolos. Adição de informações de contacto em caso de eventos adversos. Remoção da referência n.º 4 e renumeração das referências. Adição de uma tabela de histórico de revisões. Declaração de perigo adicional para 854C-20ML e 855-20ML. Adição de Advertências e Perigos. Adicionadas informações CH-REP.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

O M inicial e Sigma-Aldrich são marcas comerciais da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha ou das respetivas afiliadas. Todas as outras marcas comerciais pertencem aos respetivos proprietários. Estão disponíveis informações detalhadas sobre marcas comerciais através de recursos acessíveis ao público.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Οδηγίες χρήσης

Κιτ αλκαλικής φωσφατάσης λευκοκυττάρων

Διαδικασία αρ. 85



Προοριζόμενη χρήση

Τα κιτ αλκαλικής φωσφατάσης της Sigma-Aldrich προορίζονται ως ιστολογική χρώση γενικής εργαστηριακής χρήσης. Τα αντιδραστήρια αλκαλικής φωσφατάσης προορίζονται μόνο για επαγγελματική «in vitro διαγνωστική χρήση». Αυτή η μη αυτόματη, ποιοτική, ιστοχημική διαδικασία αναγνωρίζει τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στα λευκοκύτταρα σε φιλμ ανθρώπινου αίματος ή μυελού των οστών. Η ιστολογική οπτικοποίηση της σχετιζόμενης με τα λευκοκύτταρα αλκαλικής φωσφατάσης είναι μια μοναδική τεχνική που επί του παρόντος χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική.

Το 1929, ο Kay υποστήριξε για πρώτη φορά την παρουσία αλκαλικής φωσφατάσης στα λευκοκύτταρα.¹ Ωστόσο, μόνο ύστερα από πολλά χρόνια αργότερα ο Karlow εισήγαγε μια πρακτική μέθοδο χρώσης για την αναγνώριση του ενζύμου των λευκοκυττάρων.² Ο Karlow χρησιμοποίησε α-ναφθυλο-φωσφορικό νάτριο ως υπόστρωμα, fast blue RR ως άλας διαζωνίου και πρότεινε μια μέθοδο βαθμολόγησης για ημιποσοτικές συγκρίσεις.² Επίσης, προτάθηκαν βελτιώσεις που είχαν ως αποτέλεσμα την καλή διατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας. Κατόπιν, το α-ναφθυλο-φωσφορικό αντικαταστάθηκε με naphthol AS phosphate. Άξιζε να σημειωθεί ότι έχει βρεθεί καλή συσχέτιση μεταξύ κυτταροχημικών και βιοχημικών τεχνικών για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων (LAPA).³

Με τη μέθοδο της Sigma-Aldrich, η αλκαλική φωσφατάση των λευκοκυττάρων προσδιορίζεται σε μεμβράνες αίματος ή μυελού των οστών αφού μονιμοποιηθούν ήπια σε αντικειμενοφόρους. Στη συνέχεια, τα μονιμοποιημένα φιλμ επωάζονται σε διάλυμα που περιέχει naphthol AS-MX phosphate. Ως αποτέλεσμα της δραστηριότητας της φωσφατάσης, το naphthol AS-MX απελευθερώνεται και αμέσως πραγματοποιεί σύζευξη με ένα άλας διαζωνίου, σχηματίζοντας μια αδιάλυτη, ορατή χρωστική στα σημεία δραστηριότητας της φωσφατάσης.

Αντιδραστήρια

Άλας Fast Blue RR (Αρ. καταλόγου FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, Προζυγισμένα καψάκια. Το πραγματικό βάρος ανά καψάκι θα ποικίλλει ανάλογα με την παρτίδα της χρωστικής και έχει βεβαιτοποιηθεί μέσω δοκιμασίας.

Αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-MX Phosphate (Αρ. καταλόγου 855-20ML)
Naphthol AS-MX phosphate, 0,25% (w/v), ρυθμιζόμενο σε pH 8,6, 25 °C. Κινδύνος. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΓΟΣΗΣ: Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.

Διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer (Αρ. καταλόγου MHS1-100ML)

Αιματοξυλίνη, πιστοποιημένη, 1 g/L, C.I. 75290, ιωδικό νάτριο, 0,2 g/L, αργίλιο υδροξείδιο του αμμωνίου, 5 g/L, και σταθεροποιητές

Συμπυκνωμένο διάλυμα κιτρικού οξέος (Αρ. καταλόγου 854C-20ML)

Κιτρικό οξύ-κιτρικό νάτριο, 1,5 mol/L. Κινδύνος. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό βλάβη. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

Ειδικά υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Συμπύκνωμα υποκατάστατο νερού βρύσης Scott, Αρ. καταλόγου S5134
- Ακετόνη, αντιδραστήριο ACS

Φύλαξη και σταθερότητα

Φυλάσσετε το άλας Fast Blue RR σε θερμοκρασία κάτω των 0 °C. Φυλάσσετε το αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-MX Phosphate σε ψυγείο (2–8 °C). Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Φυλάσσετε το διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer με το καπάκι ερμητικά κλειστό, σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C), προστατευμένο από το φως. Μην εισπνέετε το διάλυμα στον αρχικό περιέκτη μετά τη χρήση σε δοχείο Corlin. Απορρίψτε όταν ο χρόνος που απαιτείται για την κατάλληλη χρώση υπερβαίνει τον συνιστώμενο χρόνο της διαδικασίας κατά περισσότερα από 5 λεπτά.

Φυλάσσετε το συμπυκνωμένο διάλυμα κιτρικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Φυλάσσετε το κιτρικό διάλυμα εργασίας σε ψυγείο (2–8 °C). Τα κιτρικά διαλύματα είναι κατάλληλα για χρήση απουσία μικροβιακής ανάπτυξης.

Παρασκευή

Το άλας Fast Blue RR, το αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-MX Phosphate και το διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer παρέχονται έτοιμα για χρήση στη διαδικασία.

Παρασκευάστε κιτρικό διάλυμα εργασίας αραιώνοντας 2 mL συμπυκνωμένο διάλυμα κιτρικού οξέος σε 100 mL απιονισμένου νερού.

Για την παρασκευή μονιμοποιητικού διαλύματος (ακετόνη με κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα, 60%), θερμάνετε το κιτρικό διάλυμα εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Με συνεχή ανάδευση, προσθέστε 2 όγκους κιτρικού διαλύματος εργασίας σε 3 όγκους ακετόνης. Απορρίψτε μετά τη χρήση.

Το διάλυμα εργασίας υποκατάστατο νερού βρύσης Scott παρασκευάζεται αραιώνοντας 1 όγκο συμπυκνωμένου υποκατάστατο νερού βρύσης Scott με 9 όγκους απιονισμένου νερού.

Προφυλάξεις

Αυτά τα βοηθήματα IVD προορίζονται για in vitro διαγνωστική χρήση σε περιβάλλον κλινικού εργαστηρίου. Αυτά τα βοηθήματα IVD προορίζονται για επαγγελματική χρήση μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό. Τα βοηθήματα IVD της Sigma-Aldrich μπορούν να χρησιμοποιούνται από εργαστηριακό προσωπικό το οποίο είναι εκπαιδευμένο να χειρίζεται ανθρώπινα δείγματα που μπορεί να είναι μολυσματικά, να χρησιμοποιεί μικροσκόπια και άλλον εργαστηριακό εξοπλισμό και διαθέτει αντίληψη των χρωμάτων και οπτική οξύτητα για να διακρίνει τα χρώματα και άλλα αντικείμενα κάτω από το μικροσκόπιο.

Πρέπει να ακολουθούνται οι συνήθειες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό εργαστηριακών αντιδραστηρίων. Απορρίψτε τα απόβλητα τηρώντας όλους τους τοπικούς, πολιτειακούς, περιφερειακούς ή εθνικούς κανονισμούς.

Διαδικασία

Συλλογή δειγμάτων

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσφατα παρασκευασμένα φιλμ αίματος ή μυελού των οστών ή δείγματα με ηπαρίνη.⁴ ΑΠΟΦΥΓΕΤΕ το EDTA.⁴ Τα επιχρίσματα αίματος θα πρέπει να χρωματίζονται για ενδομική δραστηριότητα εντός 8 ωρών μετά την παρασκευή. Ωστόσο, εάν αυτό δεν είναι δυνατό, η σταδιακή απώλεια της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί να καθυστερήσει με μονιμοποίηση και φύλαξη κατά τη διάρκεια της νύχτας σε καταψύκτη.⁴ Τα φιλμ θα πρέπει να στεγνώνονται για τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη μονιμοποίηση και 3 ώρες μετά τη μονιμοποίηση πριν από την κατάψυξη.

Σημειώσεις

Υπάρχουν πολύ περιορισμένα στοιχεία για τις ενώσεις που μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων (LAPA). Ορισμένα φάρμακα και άλλες ουσίες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα της κυκλοφορούσας αλκαλικής φωσφατάσης.⁵ Τα από του στόματος αντισυλληπτικά, η κορτιζόλη και το στρες μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένες βαθμολογίες αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων.⁶

Εκτελέστε τη διαδικασία χρησιμοποιώντας θετικά υλικά ελέγχου. Αυτά μπορούν να ληφθούν από ασθενείς με πυογενή λευκοκυττάρωση ή γυναίκες στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης ή κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τον τοκετό. Οι βαθμολογίες αλκαλικής φωσφατάσης λευκοκυττάρων από αυτά τα άτομα συνήθως υπερβαίνουν το 100. Ένα αρνητικό υλικό ελέγχου μπορεί να παρασκευαστεί από ένα κανονικό μονιμοποιημένο επιχρίσμα, ευβαπτίζοντάς το σε βραστό νερό για 1 λεπτό ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο. Τα φιλμ ελέγχου μπορούν να διατηρηθούν έως και 1 έτος εάν φυλαχθούν μονιμοποιημένα, τυλιγμένα σε Parafilm® στους –70 °C. Αυτά τα φιλμ πρέπει να στεγνώνονται στον αέρα τουλάχιστον 1 ώρα πριν από τη μονιμοποίηση και 3 ώρες μετά τη μονιμοποίηση πριν από την κατάψυξη.

Συνιστάται ανεπιφύλακτα κάθε εργαστήριο να καθορίζει το δικό του αναμενόμενο εύρος, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για τον τοπικό πληθυσμό.

Η διαδικασία εξαρτάται από την υποκειμενική αξιολόγηση των χρωματισμένων κυττάρων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ευρεία διακύμανση των αξιολογήσεων που λαμβάνονται. Η θερμοκρασία του μείγματος αντίδρασης πρέπει να διατηρείται μεταξύ 18–26 °C. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες θα έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικά χαμηλότερες βαθμολογίες. Πάνω από τους 30 °C, θα εμφανιστούν αξιοσημείωτες αυξήσεις στη δραστηριότητα. Τα ημισιμόφιλα δεν χρωματίζονται, αλλά μπορούν να αναγνωριστούν από τους διόλους πυρήνες και τα μεγάλα διαθλαστικά κοκκία.

Διαδικασία

1. Μετρήστε 48 mL απεσταγμένου νερού σε κατάλληλο περιέκτη και ρυθμίστε τη θερμοκρασία στους 18–26 °C.
2. Παρασκευάστε διάλυμα άλατος διαζωνίου: Διαλύστε το περιεχόμενο ενός καψακίου άλατος Fast Blue RR σε απεσταγμένο νερό (από το Βήμα 1). Ένας μαγνητικός αναδευτήρας μπορεί να είναι χρήσιμος.
3. Προσθέστε 2 mL αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-MX Phosphate στο αραιωμένο διάλυμα άλατος διαζωνίου (από το Βήμα 2). Αναμείξτε.
4. Φέρτε το μονιμοποιητικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Μονιμοποιήστε τις αντικειμενοφόρους μεμβράνες σε μονιμοποιητικό διάλυμα για 30 δευτερόλεπτα. Ξεπλύνετε ήπια σε απιονισμένο νερό για 45 δευτερόλεπτα. Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
5. Προσθέστε τις αντικειμενοφόρους στο μείγμα αλκαλικής χρωστικής (από το Βήμα 3) και επωάστε στους 18–26 °C για 30 λεπτά. Προστατεύετε τις εμβοπισμένες αντικειμενοφόρους από το άμεσο ηλιακό φως. Απορρίψτε το μείγμα αλκαλικής χρωστικής μετά τη χρήση.
6. Μετά από 30 λεπτά, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους και ξεπλύνετε καλά σε απιονισμένο νερό για 2 λεπτά. Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
7. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer για 10 λεπτά.
8. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους που έχουν υποστεί αντίχρωση για 3 λεπτά σε απιονισμένο νερό. Αυτό θα οδηγήσει σε πυρηνική χρώση με κόκκινο ιώδες.
9. Αξιολογήστε μικροσκοπικά. Εάν απαιτείται κάλυψη με καλυπτρίδα, χρησιμοποιήστε μόνο υατικά μέσα κάλυψης.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τρόπος βαθμολόγησης

Σαρώστε το φιλμ (900X) και επιλέξτε μια λεπτή περιοχή στην οποία μόλις που ακουμπούν τα ερυθροκύτταρα. Τα σημεία δραστηριότητας της φωσφατάσης θα εμφανίζονται με τη μορφή μπλε κοκκίων. Επιλέξτε 100 διαδοχικά ραβδόσηρα και πολυμορφόσηρα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Βαθμολογήστε από 0 έως 4+ με βάση την ποσότητα και την ένταση της καταβλησμένης χρωστικής μέσα στο κυτταρόπλασμα αυτών των κυττάρων. Για τα χαρακτηριστικά της βαθμολογίας, ανατρέξτε στον Πίνακα 1. Το άθροισμα των αξιολογήσεων 100 κυττάρων θεωρείται βαθμολογία.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά βαθμολογίας*

Καταβυθισμένη αξωχρωστική στο κυτταρόπλασμα				Υπόβαθρο κυτταροπλάσματος
Βαθμο-λογία κυττάρου	Ποσότητα** (%)	Μέγεθος κοκκίου	Ένταση χρώσης	
0+	Καθόλου	-	Καθόλου	Καθόλου
1+	50	Μικρό	Αμυδρή έως μέτρια	Άχρωμο έως πολύ απαλό μπλε
2+	50-80	Μικρό	Μέτρια έως έντονη	Άχρωμο έως απαλό μπλε
3+	80-100	Μεσαίο έως μεγάλο	Έντονη	Άχρωμο έως μπλε
4+	100	Μεσαίο έως μεγάλο	Πολύ έντονη	Μη ορατό

* Ο Πίνακας 1 αντιπροσωπεύει την τροποποίηση των παρατηρήσεων που έγιναν από τον Karlow.^{2,3}
** Ποσοστό όγκου του κυτταροπλάσματος που καταλαμβάνεται από ιζήμα αξωχρωστικής.

Για να ληφθεί η βαθμολογία της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων (LAPA), ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν πολλαπλασιάζεται με την τιμή για τη βαθμολογία κυττάρου. Αυτοί οι αριθμοί προστίθενται για να ληφθεί η βαθμολογία LAPA όπως φαίνεται στα ακόλουθα παραδείγματα:

Βαθμολογία κυττάρου	Καταμετρηθείσα Βαθμολογία	Βαθμολογία LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Σύνολο	100	67

Αναμενόμενες τιμές

Οι ακόλουθες βαθμολογίες ελήφθησαν στη Sigma-Aldrich για 20 φυσιολογικά άτομα. Η λήψη αίματος έγινε σε ηπαρινισμένα σωληνάρια και τα φιλμ παρασκευάστηκαν εντός μίας ώρας.

Fast Blue RR	
Μέσος όρος LAPA ± 1SD	96±44
Εύρος LAPA	52-140

Το ακόλουθο εύρος βαθμολογιών ελήφθη από αυτά τα 20 φυσιολογικά άτομα:

Fast Blue RR
32-182

Εάν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα διαφέρουν από τα αναμενόμενα, επικοινωνήστε με την τεχνική υπηρεσία της Sigma-Aldrich για βοήθεια.

Αναμενόμενες παρατηρήσεις

Στους ανθρώπους, η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης περιορίζεται στα ώριμα και ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Περιστασιακά, μπορεί να παρατηρείται ασθενής χρώση στα λεμφοκύτταρα. Οι οστεοβλάστες του μυελού των οστών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα χρωματίζονται έντονα.

Παρασκευάστηκε μια σειρά αντικειμενοφόρων χρησιμοποιώντας αίμα που ελήφθη από φυσιολογικά άτομα, γυναίκες στο τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, ασθενείς κατά την πρώτη περίοδο μετά τον τοκετό και άτομα που εμφάνιζαν λευχαιμοειδή αντίδραση. Οι αρνητικοί έλεγχοι παρασκευάστηκαν με θερμική αδρανοποίηση όπως περιγράφεται. Εκτελέστηκαν διάφοροι συνδυασμοί Fast Blue RR και αντιχρώσεων (διάλυμα κυανού του μεθυλενίου και διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer) εις διπλούν και βαθμολογήθηκε η ΛΑΡΑ. Οι τιμές που ελήφθησαν σε πολλαπλές αντικειμενοφόρους που παρασκευάστηκαν για κάθε άτομο σχεδόν συνέπιπταν και δεν φάνηκαν να επηρεάζονται από την τεχνική χρώσης/αντιχρώσης που χρησιμοποιήθηκε. Για παράδειγμα, σε 7 επιχρίσματα που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας αίμα από ασθενή κατά την προγεννητική περίοδο δόθηκαν βαθμολογίες που κυμαίνονταν από 235–269 με μέση, τυπική απόκλιση και συντελεστή διακύμανσης 255, 11,3 και 4,4% αντίστοιχα. Στους αρνητικούς ελέγχους διαπιστώθηκε πλήρης απουσία χρωματισμένου υλικού.

Χαρακτηριστικά απόδοσης της ανάλυσης

Τα αποτελέσματα απόδοσης της ανάλυσης για τις δεδομένες δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε όλες τις συσχευόμενες δομές, επιβεβαιώνουν την ευαισθησία, την ειδικότητα και την επαναληψιμότητα σε ποσοστό 100%.

Αρ. κατα-λόγου	Περιγραφή προϊόντος	Στόχος	Ειδικότητα εντός της ανάλυσης	Ευαισθησία εντός της ανάλυσης	Ειδικότητα μεταξύ των αναλύσεων	Ευαισθησία μεταξύ των αναλύσεων
FBS25	Άλας Fast Blue RR	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
855	Αλκαλικό διάλυμα Naphthol AS-MX Phosphate	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
MHS1	Διάλυμα αιματοξυλίνης Mayer	Πυρήνες	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3
854C	Συμπυκνωμένο διάλυμα κίτρικού οξέος	Σημεία δραστηριότητας	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3	3 στα 3

Προειδοποιήσεις και κίνδυνοι

Ανατρέξτε στο Δελτίο δεδομένων ασφαλείας και στην επισήμανση προϊόντος για οποιοσδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνων ή ασφαλείας.

85L1:



H290 Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.

H331 Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής.

P234 Να διατηρείται μόνο στην αρχική συσκευασία.

P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σταγονίδια ή ατμούς.

P271 Να χρησιμοποιείται μόνο σε ανοικτό ή καλά αεριζόμενο χώρο.

P304 + P340 + P311 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.

P390 Σκουπίστε τη χυμνή ποσότητα για να προλάβετε υλικές ζημιές.

P403 + P233 Αποθηκεύεται σε καλά αεριζόμενο χώρο. Να διατηρείται ο περιέκτης ερμητικά κλειστός.

85L2:



H290 Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.

H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

H331 Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής.

P234 Να διατηρείται μόνο στην αρχική συσκευασία.

P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.

P264 Πλύνετε την επιδερμίδα σχολαστικά μετά τον χειρισμό.

P271 Να χρησιμοποιείται μόνο σε ανοικτό ή καλά αεριζόμενο χώρο.

P304 + P340 + P311 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.

P305 + P351 + P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλύνετε.

Εάν, κατά τη διάρκεια της χρήσης αυτού του βοηθήματος ή ως αποτέλεσμα της χρήσης του, έχει συμβεί κάποιο σοβαρό περιστατικό, παρακαλείστε να το αναφέρετε στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στην εθνική αρχή της χώρας σας.

Ορισμοί συμβόλων

Σύμβολα όπως ορίζονται στο EN ISO 15223-1:2021

	Κατασκευαστής		Αριθμός καταλόγου
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Αριθμός παρτίδας
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα/Ευρωπαϊκή Ένωση		Δήλωση συμμόρφωσης Ευρωπαϊκής Ένωσης (όπως ορίζεται στην οδηγία IVDR 2017/746)
	Ημερομηνία λήξης		In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Όριο θερμοκρασίας		Προσοχή
	Ημερομηνία παραγωγής		Εισαγωγέας
	Υποδεικνύει τον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπο στην Ελβετία		

Βιβλιογραφικές αναφορές

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για να κάνετε μια παραγγελία, παρακαλούμε επισκεφθείτε τον ιστότοπό μας στη διεύθυνση [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Για τεχνική εξυπηρέτηση, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη σελίδα τεχνικής εξυπηρέτησης στον ιστότοπό μας στη διεύθυνση [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Ιστορικό αναθεωρήσεων

Αναθ. 2.0	2014
Αναθ. 3.0	2016
Αναθ. 4.0	2023
Έγινε μεταφορά σε νέο υπόδειγμα με την τρέχουσα επωνυμία. Προσδιορίστηκε για επαγγελματική χρήση στην προαριζόμενη χρήση και τις προφυλάξεις. Η προαριζόμενη χρήση αναθεωρήθηκε για ευθυγράμμιση με τις κατευθυντήριες γραμμές IVDR. Το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού ενημερώθηκε σε Δελτίο δεδομένων ασφαλείας. Ενημερώθηκαν οι πληροφορίες επικοινωνίας. Αφαιρέθηκε η οδηγία να ακολουθείται το CLSI για τη συλλογή δειγμάτων. Αφαιρέθηκε το EN 980 και άλλαξε σε EN ISO 15223-1:2021 για τα σύμβολα. Προστέθηκαν πληροφορίες επικοινωνίας για ανεπιθύμητα συμβάντα. Αφαιρέθηκε η βιβλιογραφική αναφορά 4 και αντιστοιχίστηκε νέα αρίθμηση στις βιβλιογραφικές αναφορές. Προστέθηκε πίνακας ιστορικού αναθεωρήσεων. Προστέθηκε πρόσθετη δήλωση κινδύνου για τα 854C-20ML και 855-20ML. Προσθήκη προειδοποιήσεων και κινδύνων. Προστέθηκαν πληροφορίες εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου για την Ελβετία (CH-REP).	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Το αρχικό γράμμα M και το Sigma-Aldrich είναι εμπορικά σήματα της Merck KGaA, Darmstadt, Germany ή των συνδεδεμένων με αυτήν εταιρειών. Όλα τα άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα είναι διαθέσιμες μέσω δημοσίων προβάσιμων πόρων.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Használati utasítás

Leukocita alkalikus foszfatáz készlet

85. sz. eljárás



Rendeltetésszerű használat

A Sigma-Aldrich alkalikus foszfatáz készlet általános laboratóriumi felhasználásra szánt szövettani festék. Az alkalikus foszfatáz reagensek kizárólag professzionális „*in vitro*” diagnosztikai felhasználásra” szolgálnak. Ez a manuális, kvalitatív hisztokémiai eljárás kimutatja az alkalikus foszfatáz aktivitást az emberi vér- és csontvelőkenetekben lévő leukocitákban. A leukocitákhoz kapcsolódó aktivitását foszfatáz szövettani megjelenítése egy egyedülálló, az orvostudományban jelenleg általánosan használt technika.

Kay először 1929-ben írt az alkalikus foszfatáz leukocitákban való feltételezett jelenlétéről.¹ Azonban csak sok évvel később, Kaplow vezetett be egy gyakorlati festési módszert a leukocitában lévő enzim kimutatására.² Kaplow nátrium- α -naftil-foszfatot használt szubsztrátként, Fast Blue RR-t diazóniumsóként, és pontozási módszert javasolt a félkvantitatív összehasonlításához.² Emellett a sejtmorfológia jobb megőrzését eredményező módosításokat is javasolt. Ezt követően az α -naftil-foszfatot naftol-AS-foszfatál helyettesítették. Érdemes megjegyezni, hogy a leukocitákban lévő alkalikus foszfatáz aktivitásának (LAPA) vizsgálataira alkalmazott citokémiai és biokémiai technikák között erős korrelációt találtak.³

A Sigma-Aldrich módszerével a leukociták alkalikus foszfatázát vér- vagy csontvelőkenetekben határozzák meg, miután azokat óvatosan tárgylemezekre fixálták. A fixált keneteket ezután naftol-AS-MX-foszfatot tartalmazó oldatban inkubálják. A foszfatázaktivitás eredményeként a naftol-AS-MX felszabadul, és azonnal a diazóniumsóhoz kötődik, oldhatatlan, látható pigmentet képezve a foszfatázaktivitás helyén.

Reagensek

Fast Blue RR só (kat. sz.: FBS25-10CAP)
Fast Blue, C.I. 37155, előre lemerített kapszulák. A kapszulánkénti tényleges tömeg a festék adott tételetől függően változik, és azt vizsgálattal optimalizálták.

Naftol-AS-MX-foszfat alkalikus oldat (kat. sz.: 855-20ML)
Naftol-AS-MX-foszfat, 0,25% (w/v), 25 °C-on 8,6 pH-értékre pufferelve. Vesztély. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Légúti irritációt okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. LENYELÉS ESETÉN: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

Mayer-féle hematoxilinolod (kat. sz.: MHS1-100ML)
Tanúsított hematoxinil, 1 g/l, C.I. 75290; nátrium-jodát, 0,2 g/l; alumínium-ammónium-hidroxid, 5 g/l; és stabilizálószer

Citrátkoncentrátum (kat. sz.: 854C-20ML)
Citromsav - nátrium-citrát, 1,5 mol/l. Vesztély. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. Légúti irritációt okozhat. Védőkesztyű/ szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Szükséges, de nem biztosított speciális anyagok

- Scott-féle csapvíz-helyettesítő koncentrátum (kat. sz.: S5134)
- Aceton, ACS-reagensminőség

Tárolás és stabilitás

A Fast Blue RR só 0 °C alatt tárolandó. A naftol-AS-MX-foszfat alkalikus oldatot hűtőszekrényben (2–8 °C) kell tárolni. A reagensek a lejárat dátumig stabilak.

A Mayer-féle hematoxilinolodot szorosan lezárva, szobahőmérsékleten (18–26 °C), fénytől védve kell tárolni. Az oldatot nem szabad az eredeti tartályba visszahelyezni a küvetában történő használat után. Dobja ki, ha a megfelelő festéshez szükséges idő több mint 5 perccel meghaladja az eljárást során ajánlott időt.

A citrátkoncentrátumot szobahőmérsékleten (18–26 °C) kell tárolni. A citrátmunkaoldatot hűtőszekrényben (2–8 °C) kell tárolni. A citrátoldatot mikrobiális növekedés hiányában használhatók.

Előkészítés

A Fast Blue RR só, a naftol-AS-MX-foszfat alkalikus oldata és a Mayer-féle hematoxilinolodot használatra kész állapotban kerül forgalomba.

A citrátmunkaoldatot elkészítéséhez hígítson 2 ml citrátkoncentrátumot 100 ml-re ioncserélt vízzel.

A fixáló (citrátpufferelt aceton, 60%) elkészítéséhez melegítse a citrátmunkaoldatot szobahőmérsékletre (18–26 °C). Folyamatos keverés mellett adjon 2 térfogatrészt citrátmunkaoldatot 3 térfogatrészt acetonhoz. Használat után dobja ki.

A Scott-féle csapvíz-helyettesítő munkaoldatának elkészítéséhez hígítson 1 rész Scott-féle csapvíz-helyettesítő koncentrátumot 9 rész ioncserélt vízzel.

Óvintézkedések

Ezeket az *in vitro* diagnosztikai eszközöket klinikai laboratóriumi környezetben történő *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szánták. Ezeket az *in vitro* diagnosztikai eszközöket csak képzett szakemberek használhatják. A Sigma-Aldrich *in vitro* diagnosztikai eszközöket olyan laboratóriumi személyzet üzemeltetheti, akik képzettek az esetlegesen fertőző emberi minták kezelésére, mikroszkópok és egyéb laboratóriumi berendezések használatában, valamint kellő színérzékeléssel és látásélességgel rendelkeznek a színek és egyéb tárgyak mikroszkóp alatt történő megkülönböztetésére.

A laboratóriumi reagensek kezelése során a szokásos óvintézkedéseket kell követni. A hulladékok a helyi, állami, tartományi vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Eljárás

Mintavétel

Friss vér- vagy csontvelőkenetek vagy heparinnal antikoagulált minták használhatók.⁴ KERÜLJE AZ EDTA ALKALMAZÁSÁT.⁴ A vérkeneteket az elkészítéstől számított 8 órán belül meg kell festeni az enzimaktivitás tekintetében. Ha azonban ez nem lehetséges, az alkalikus foszfatáz aktivitásának fokozatos megszűnését a fixálás és az éjszakai át fagyasztva történő tárolás késleltetheti.⁴ A keneteket a fixálás előtt legalább 1 órával, a fixálást követően a fagyasztás előtt pedig 3 órával meg kell szárítani.

Megjegyzések

Kevés adat áll rendelkezésre olyan vegyületekről, amelyek befolyásolhatják a leukociták alkalikus foszfatázának aktivitását (LAPA). Egyes gyógyszerekről és más anyagokról ismert, hogy hatással vannak a keringő alkalikus foszfatáz aktivitására.⁵ Az orális fogamzásgátlók, a kortizol és a stressz a leukocita alkalikus foszfatáz pontszámának emelkedését eredményezheti.⁶

Végezze az eljárást pozitív kontrollok alkalmazásával. Ilyen mintákat piogén leukocitózisban szenvedő betegektől, illetve a terhesség harmadik trimeszterében vagy a szülés utáni első néhány napon belül lévő nőktől lehet szerezni. Ezen személyeknél a leukocita alkalikus foszfatázra vonatkozó értékek általában meghaladják a 100-at. Egy normál fixált kenetből úgy készíthető negatív kontroll, hogy az enzimet 1 percig forrásban lévő vízbe meríti az enzim inaktiválásához. A kontrollkeneteket 1 évig is megőrizhetők, ha fixált állapotban, –70 °C-on Parafilm®-be csomagolva tárolják őket. Ezeket a keneteket a fixálás előtt legalább 1 órával, a fixálást követően a fagyasztás előtt pedig 3 órával meg kell szárítani a levegőn.

Kifejezetten ajánlott, hogy minden laboratórium saját, a helyi lakosságra jellemző, várható tartományt határozzon meg.

Az eljárás a megfestett sejtek subjektív minősítésétől függ. Ez a kapott minősítések széles skáláját eredményezheti. A reakcióelegy hőmérsékletét 18–26 °C között kell tartani. Az alacsonyabb hőmérséklet lényegesen alacsonyabb pontszámot eredményez. 30 °C felett az aktivitás számottevő emelkedése tapasztalható. Az eozinofil sejtek nem festődnek, de felismerhetők a kétkaréjos sejtmagok és a nagy, fénytörést mutató granulumok miatt.

Eljárás

1. Mérjen 48 ml desztillált vizet egy megfelelő tartályba, és állítsa a hőmérsékletet 18–26 °C-ra.
2. Készítse el a diazóniumsó oldatát:
Oldja fel egy Fast Blue RR sókapszula tartalmát ioncserélt vízben (1. lépés). Ajánlott mágneses keverőt használni.
3. Adjon 2 ml naftol-AS-MX-foszfat alkalikus oldatot a hígított diazóniumsó-oldathoz (2. lépés). Keverje össze.
4. Melegítse a fixálót szoba-hőmérsékletre (18–26 °C). Fixálja a tárgylemezeket 30 másodpercig a fixálóba merítve. Öblítse őket óvatosan ioncserélt vízben 45 másodpercig. Ne hagyja, hogy a lemezek megszáradjanak.
5. Helyezze a tárgylemezeket az alkalikus festékeverékbe (3. lépés), és inkubálja őket 18–26 °C-on 30 percig. Védje a bemerített tárgylemezeket a közvetlen fénytől. Használat után az alkalikus festékeveréket ki kell dobni.
6. 30 perc elteltével távolítsa el a tárgylemezeket, és alaposan öblítse őket ioncserélt vízzel 2 percig. Ne hagyja, hogy a lemezek megszáradjanak.
7. Helyezze a lemezeket Mayer-féle hematoxilinolodba 10 percre.
8. Öblítse az ellenfestett tárgylemezeket 3 percig ioncserélt vízzel. Ez vörös-lila sejtmagi festődést fog eredményezni.
9. Végezze el a lemezek mikroszkópos értékelését. Ha fedőlemezelt szükséges, csak vizes fedőközeget használjon.

Teljesítményjellemzők

A pontozás módja

Vizsgálja meg a kenetet (900x), és válasszon ki egy vékony területet, ahol az eritrociták alig érintkeznek. A foszfatázaktivitás helyei kék szemcsékként jelennek meg. Válasszon ki 100 egymást követő szegmentált és szalagos neutrofil granulocitát. A kicsapódott festék citoplazmában megfigyelhető mennyisége és intenzitása alapján osztályozza a sejteket 0 és 4+ között. A pontozási jellemzőket lásd az 1. táblázatban. A pontszám 100 sejt értékelésének összege.

1. táblázat Pontozási jellemzők*

A citoplazmában kicsapódott azofesték				A citoplazma háttere
Sejt értékelése	Mennyiség** (%)	Szemcseméret	Festődés intenzitása	
0+	Nincs	-	Nincs	Nincs
1+	50	Kicsi	Halvány-közepes	Színtelen vagy nagyon halvány kék
2+	50–80	Kicsi	Közepes-erős	Színtelen vagy halványkék
3+	80–100	Közepes-nagy	Erős	Színtelen vagy kék
4+	100	Közepes-nagy	Ragyogó	Nem látható

* Az 1. táblázat Kaplow megfigyeléseinek módosítását mutatja.^{2,3}

** A citoplazma azofestékből képződött csapadék által elfoglalt térfogatának százalékos aránya.

A leukocita alkalikus foszfatáz aktivitási (LAPA) pontszám meghatározásához a megszámlált sejtek számát meg kell szorozni a sejtmínősítési értékekkel. Ezeket a számokat össze kell adni a LAPA-pontszám kiszámításához, amint azt az alábbi példák mutatják:

Sejt értékelése	Összeszámlált sejtek pontszáma	LAPA-pontszám
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Összesen	100	67

Várt értékek

A következő pontszámokat 20 egészséges egyénre vonatkozóan kapták a Sigma-Aldrich vállalattól. A vért heparinnal kezelt csövekbe vették le, keneteket pedig egy órán belül készítették.

Fast Blue RR	
LAPA átlaga $\pm$ 1 szórás	96 $\pm$ 44
LAPA-tartomány	52-140

A következő pontszámartományt a fent említett 20 egészséges személyre vonatkozóan kapták:

Fast Blue RR
32–182

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várt eredményektől, kérjük, forduljon a Sigma-Aldrich műszaki szolgálatához segítségért.

Várható megfigyelések

Emberekben az alkalius foszfatáz aktivitása az érett és a szalagszerű granulocitákra korlátozódik. A limfocitákban esetenként gyenge festődés figyelhető meg. A csontvelő oszteoblaszt sejtei és az endotélsejtek erősen festődnek.

Több tárgylemez készített egészséges alanyoktól, a terhesség utolsó harmadában lévő nőktől, a szülés utáni korai időszakban lévő betegektől és leukemoid reakciót mutató személyektől származó vér felhasználásával. A negatív kontrollokat a leírtak szerinti hőinaktiválással készítették el. A Fast Blue RR és az ellenfestések (metilénkékoldat és Mayer-féle hematoxilinoladat) különböző kombinációit ismétlésekkel végezték el, és így számolták a LAPA-pontszámot. Az egyes alanyok esetén elkészített több tárgylemezen kapott értékek szoros egyezést mutattak, és nem befolyásolta őket az alkalmazott festési/ellenfestési technika. Például egy prenatális betegől származó vér felhasználásával készített 7 kenet esetén 235–269 közötti pontszámot kaptak; az átlag 255, a szórás 11,3 és a variációs koefficiens 4,4% volt. A negatív kontrollok a festődött anyag teljes hiányát mutatták.

Analitikai teljesítményjellemzők

Az adott tesztet analitikai teljesítményjellemzői az összes célstruktúrán vizsgálva 100% érzékenységet, specifikitást és ismételhetőséget igazoltak.

Kat. sz.	Termékleírás	Cél	Tesztben belüli specifikitás	Tesztben belüli érzékenység	Tesztek közötti specifikitás	Tesztek közötti érzékenység
FBS25	Fast Blue RR só	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
855	Naftol-AS-MX-foszfat alkalikus oldat	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3
MHS1	Mayer-féle hematoxilinoladat	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3
854C	Citrátkoncentrátum	Aktivitás helye	3/3	3/3	3/3	3/3

Figyelmeztetések és veszélyek

A frissített kockázati, veszélyességi és biztonsági információkért olvassa el a biztonsági adatlapot és a termék címkézését.

85L1:



H290 Fémekre korrózív hatású lehet.

H331 Belélegezve mérgező.

P234 Az eredeti csomagolásban tartandó.

P261 Kerülje a köd/gőzök belélegzését.

P271 Kizárólag szabadban vagy jól szellőző helyiségben használható.

P304 + P340 + P311 BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.

P390 A kiömlött anyagot fel kell itatni a körülvevő anyagok károsodásának megelőzése érdekében.

P403 + P233 Jól szellőző helyen tárolandó. Az edény szorosan lezárva tartandó.

85L2:



H290 Fémekre korrózív hatású lehet.

H319 Súlyos szemirritációt okoz.

H331 Belélegezve mérgező.

P234 Az eredeti csomagolásban tartandó.

P261 Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.

P264 A használatot követően a bőrt alaposan meg kell mosni.

P271 Kizárólag szabadban vagy jól szellőző helyiségben használható.

P304 + P340 + P311 BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.

P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

Ha az eszköz használata során vagy annak használata következtében súlyos baleset történt, kérjük, jelentse azt a gyártónak és/vagy meghatalmazott képviselőjének és a helyi nemzeti hatóságnak.

Jelmagyarázat

Az EN ISO 15223-1:2021 szabványban meghatározott jelek

	Gyártó		Katalógusszám
	Lásd a használati utasítást		Gyártási tétel kódja
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben/Európai Unióban		Az Európai Unió megfelelőségi nyilatkozata (az IVDR 2017/746 meghatározása szerint)
	Lejárat dátum		In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Hőmérsékleti határértékek		Vigyázat!
	Gyártási dátum		Importőr
	A svájci hivatalos képviselőt jelöli		

Hivatkozások

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Elérhetőségek

Megrendelés leadásához látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Műszaki segítségért látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com/techservice](https://sigmaaldrich.com/techservice).

Átdolgozási előzmények

Rev.: 2.0	2014
Rev.: 3.0	2016
Rev.: 4.0	2023

Áthelyezve az új sablonba a jelenlegi márkajelzéssel. A professzionális használatra vonatkozó megállapítás leírása a rendeltetésszerű használat és az óvintézkedések részekben. A rendeltetésszerű használatra vonatkozó részek átdolgozása az IVDR irányelveknek való megfelelés érdekében. Az Anyagbiztonsági adatlap frissítése Biztonsági adatlapra. Az elérhetőségek frissítése. A mintagyűjtés során a CLSI követésére vonatkozó utasítás eltávolítása. Az EN 980-as szabvány szerinti jelzések eltávolítása és az EN ISO 15223-1:2021 szabvány jelzéseire változtatása. A nemkívánatos eseményekkel kapcsolatos elérhetőségek hozzáadása. A 4. hivatkozás eltávolítása, és a hivatkozások átszámozása. Átdolgozási előzménytáblázat hozzáadása. Kiegészítő veszélyességi mondatok hozzáadása a 854C-20ML és 855-20ML esetén. Figyelmeztetések és veszélyek hozzáadása. A CH-REP információ hozzáadva.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

Az „M” kezdőbetű és a Sigma-Aldrich a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) vagy leányvállalatainak védjegyei. Minden egyéb védjegy a megfelelő tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekre vonatkozó részletes információk nyilvánosan hozzáférhető forrásokon keresztül érhetők el.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Návod k použití

Souprava pro leukocytární alkalickou fosfatázu

Postup č. 85



Určené použití

Soupravy Sigma-Aldrich alkalická fosfatáza jsou určeny pro obecné laboratorní použití jako histologické barvivo. Reagencie alkalické fosfatázy jsou určeny pouze pro profesionální "diagnostické použití in vitro". Tento manuál, kvalitativní, histochemický postup prokazuje aktivitu alkalické fosfatázy v leukocytech lidské krve nebo kostní dřeně. Histologická vizualizace alkalické fosfatázy asociované s leukocyty je unikátní technikou, která se v současnosti v medicíně běžně používá.

V roce 1929 Kay poprvé zmínil přítomnost alkalické fosfatázy v leukocytech.¹ Nicméně až o mnoho let později Kaplow zavedl praktickou metodu barvení pro prokázání enzymu leukocytů.² Kaplow používal jako substrát α-naftylfosfát sodný, Fast Blue RR jako diazoniovou sůl a doporučil metodu hodnocení pro semikvantitativní srovnání.² Také navrhl zlepšení vedoucí k dobrému zachování buněčné morfologie. Následně byl α-naftylfosfát nahrazen naftol AS fosfátem. Je pozoruhodné, že byla nalezena dobrá korelace mezi cytochemickými a biochemickými technikami pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy leukocytů (LAPA).³

Metodou společnosti Sigma-Aldrich se alkalická fosfatáza leukocytů stanoví v nátěrech krve nebo kostní dřeně po jejich mírném zafixování na sklíčka. Fixované nátěry se poté inkubují v roztoku obsahujícím naftol AS-MX fosfát. V důsledku aktivity fosfatázy se naftol AS-MX uvolní a okamžitě se spojí s diazoniovou solí a v místech aktivity fosfatázy vytvoří nerozpustný, viditelný pigment.

Činidla

Sůl Fast Blue RR (kat. č. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, předvážené tobolky. Skutečná hmotnost jedné tobolky se bude lišit podle čistoty šarže barviva a byla optimalizována na základě testů.

Alkalický roztok naftol AS-MX fosfátu (kat. č. 855-20ML)

Naftol AS-MX fosfát, 0,25% (m/v), pufovaný při pH 8,6, 25 °C. Nebezpečí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Nevdechujte prach / dým / plyn / mlhu / výpary / aerosol. PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

Roztok hematoxylinu podle Mayera (kat. č. MHS1-100ML)

Hematoxylin, certifikovaný, 1 g/l, C.I. 75290, jodičnan sodný, 0,2 g/l, hydroxid hlinito-amonný, 5 g/l, a stabilizátory

Koncentrovaný roztok citrátu (kat. č. 854C-20ML)

Kyselina citronová – citronan sodný, 1,5 mol/l. Nebezpečí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné poškození očí. Nevdechujte prach / dým / plyn / mlhu / výpary / aerosol. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje.

Potřebné speciální materiály, které nejsou součástí dodávky

- Scottův koncentrát nahrazující vodu z vodovodu, katalogové č. S5134
- Aceton, ACS činidlo

Skladování a stabilita

Uchovávejte sůl Fast Blue RR při teplotě do 0 °C. Uchovávejte alkalický roztok naftol AS-MX fosfátu v chladničce (2–8 °C). Činidla jsou stabilní do data spotřeby.

Uchovávejte roztok hematoxylinu podle Mayera při pokojové teplotě (18–26 °C) a chraňte před světlem. Roztok po použití v Coplinově nádobě nevracejte do původní nádoby. Pokud doba nezbytná pro vhodné zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 5 minut, roztok zlikvidujte.

Uchovávejte koncentrovaný roztok citrátu při pokojové teplotě (18–26 °C). Uchovávejte pracovní roztok citrátu v chladničce (2–8 °C). Roztoky citrátu jsou vhodné pro použití, pokud nedochází k mikrobiálnímu růstu.

Příprava

Sůl Fast Blue RR, alkalický roztok naftol AS-MX fosfátu a roztok hematoxylinu podle Mayera jsou připraveny k použití při postupu.

Připravte pracovní roztok citrátu zředěním 2 ml roztoku koncentráту citrátu 100 ml deionizované vody.

Pro přípravu fixačního roztoku (aceton pufovaný ve fosfátu, 60%) zahřejte pracovní roztok citrátu na pokojovou teplotu (18–26 °C). Za stálého míchání přidejte 2 objemy pracovního roztoku citrátu do 3 objemů acetonu. Po použití zlikvidujte.

Pracovní roztok Scottovy náhražky vody z vodovodu se připraví zředěním 1 objemu Scottova koncentráту nahrazujícího vodu z vodovodu 9 objemy deionizované vody.

Bezpečnostní opatření

Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pro diagnostické použití in vitro v klinickém laboratorním prostředí. Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pouze pro profesionální použití kvalifikovaným personálem. Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro Sigma-Aldrich mohou být používány laboratorními pracovníky, kteří jsou vyškoleni k manipulaci s lidskými vzorky, které mohou být infekční, k používání mikroskopů a jiného laboratorního vybavení a jejich barevné vidění a ostrost zraku jsou dostatečné pro rozlišení barev a různých objektů pod mikroskopem.

Při zacházení s laboratorními činidly dodržujte běžná bezpečnostní opatření. Odpad zlikvidujte podle všech místních, regionálních či národních předpisů.

Postup

Odběr vzorků

Lze použít čerstvé nátěry nebo vzorky krve nebo kostní dřeně antikoagulované heparinem.⁴ VYHÝBEJTE SE EDTA.⁴ Krevní nátěry by měly být obarveny pro zkoumání enzymatické aktivity do 8 hodin od přípravy. Pokud to však není možné, může být postupná ztráta aktivity alkalické fosfatázy zpožděna fixací a uložením přes noc do mrazničky.⁴ Nátěry by měly být vysušeny nejméně 1 hodinu před fixací a 3 hodiny po fixaci před zmrazením.

Poznámky

Údaje o látkách, které mohou interferovat s aktivitou alkalické fosfatázy leukocytů (LAPA), jsou omezené. O některých lécích a dalších látkách je známo, že ovlivňují aktivitu alkalické fosfatázy v krevním oběhu.⁵ Perorální antikoncepce, kortizol a stres mohou vést ke zvýšenému skóre alkalické fosfatázy leukocytů.⁶

Provedte postup s použitím pozitivních kontrol. Ty lze získat od pacientů s pyogenní leukocytózou nebo od žen ve třetím trimestru těhotenství nebo během prvních několika dnů po porodu. Skóre alkalické fosfatázy leukocytů u těchto osob obvykle přesahuje 100. Negativní kontrolu lze připravit z normálního fixovaného nátěru ponořením do vroucí vody po dobu 1 minuty, aby se enzym deaktivoval. Kontrolní nátěry lze uchovávat až 1 rok, pokud jsou skladovány fixované, zabalené v obalu Parafilm® při teplotě -70 °C. Tyto nátěry by měly být vysušeny vzduchem nejméně 1 hodinu před fixací a 3 hodiny po fixaci před zmrazením.

Důrazně se doporučuje, aby si každá laboratoř stanovila vlastní očekávaný rozsah charakteristický pro místní populaci.

Postup závisí na subjektivním hodnocení zbarvených buněk. Výsledkem může být široká variabilita získaných hodnocení. Teplota reakční směsi musí být udržována v rozmezí 18–26 °C. Nižší teploty budou mít za následek výrazně nižší skóre. Při teplotě nad 30 °C dojde k výraznému zvýšení aktivity. Eozinofily se nezbarvují, ale lze je rozpoznat podle dvoulaločných jader a velkých refraktálních granulí.

Postup

1. Do vhodné nádoby odměřte 48 ml destilované vody a upravte teplotu na 18–26 °C.
2. Připravte roztok diazoniové soli: Obsah jedné tobolky soli Fast Blue RR rozpustíte v destilované vodě (z kroku 1). S tím může pomoci magnetické míchadlo.
3. Do zředěného roztoku diazoniové soli (z kroku 2) přidejte 2 ml alkalického roztoku naftolu AS-MX fosfátu. Promíchejte.
4. Fixační roztok zahřejte na pokojovou teplotu (18–26 °C). Zafixujte sklíčka ponořením do fixačního roztoku na 30 sekund. Jemně oplachujte v deionizované vodě po dobu 45 sekund. Nedoalte, aby sklíčka vyschla.
5. Přidejte sklíčka do směsi alkalických barviv (z kroku 3) a inkubujte 30 minut při teplotě 18–26 °C. Ponořená sklíčka chraňte před přímým světlem. Směs alkalických barviv po použití zlikvidujte.
6. Po 30 minutách sklíčka vyjměte a důkladně opláchněte v deionizované vodě po dobu 2 minut. Nedoalte, aby sklíčka vyschla.
7. Umístěte sklíčka do roztoku hematoxylinu podle Mayera na dobu 10 minut.
8. Opláchněte kontrastně zbarvená sklíčka v deionizované vodě po dobu 3 minut. To bude mít za následek červeně fialové zbarvení jader.
9. Mikroskopicky vyhodnoťte. Pokud je vyžadováno krycí sklíčko, použijte pouze vodné montážní médium.

Pracovní charakteristiky

Metoda hodnocení

Naskenujte nátěr (900X) a vyberte tenkou oblast, kde se erythrocyty sotva dotýkají. Místa aktivity fosfatázy se objeví jako modré granule. Vyberte 100 po sobě jdoucích segmentovaných a pásových neutrofilních granulocytů. Ohodnoťte body od 0 do 4+ na základě množství a intenzity vysráženého barviva v cytoplazmě těchto buněk. Charakteristiky hodnocení jsou uvedeny v tabulce 1. Součet hodnocení 100 buněk je považován za skóre.

Tabulka 1. Charakteristiky hodnocení*

Vysrážené azobarvivo v cytoplazmě				
Hodnocení buňky	Množství** (%)	Velikost granulí	Intenzita barvení	Pozadí cytoplazmy
0+	Žádné	-	Žádné	Žádné
1+	50	Malé	Slabé až střední	Bezbarvé až velmi světle modré
2+	50-80	Malé	Střední až silné	Bezbarvé až světle modré
3+	80-100	Střední až velké	Silné	Bezbarvé až modré
4+	100	Střední až velké	Brilantní	Není viditelné

* Tabulka 1 představuje úpravu pozorování provedenou Kaplowem.^{2,3}

** Procento objemu cytoplazmy obsazené sraženinou azobarviva.

Aby bylo možné získat skóre aktivity alkalické fosfatázy leukocytů (LAPA), počet započítaných buněk se vynásobí hodnotou pro hodnocení buněk. Tyto hodnoty se sečtou a získá se skóre LAPA, jak je znázorněno v následujících příkladech:

Hodnocení buňky	Počítané skóre	Skóre LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Celkem	100	67

Očekávané hodnoty

Následující skóre byla získána ve společnosti Sigma-Aldrich u 20 normálních osob. Krev byla odebrána do heparinizovaných zkumavek a nátěry byly připraveny do jedné hodiny.

Fast Blue RR	
Průměr LAPA ± 1SD	96±44
Rozsah LAPA	52-140

U těchto 20 normálních jedinců byl získán následující rozsah skóre:

Fast Blue RR
32-182

Pokud se pozorované výsledky liší od očekávaných výsledků, obraťte se na technický servis společnosti Sigma-Aldrich.

Očekávaná pozorování

U lidí je aktivita alkalické fosfatázy omezena na zralé a pásové granulocyty. V lymfocytech může být občas pozorováno slabé zbarvení. Osteoblasty kostní dřene a endoteliální buňky se barví silně.

Série sklíčků byla připravena s použitím krve získané od normálních subjektů, žen v posledním trimestru těhotenství, časných poporodních pacientů a osob vykazujících leukemoidní reakci. Negativní kontroly byly připraveny tepelnou inaktivací dle popisu. Různé kombinace Fast Blue RR a kontrastních barviv (roztok methylenové modři a roztok hematoxylinu podle Mayera) byly provedeny replikačně a následně byla obodována LAPA. Hodnoty získané na několika sklíčkách připravených pro každý subjekt si téměř odpovídaly a nezdálo se, že by byly ovlivněny použitou technikou barvení / kontrastního barvení. Například 7 nátěrů krve prenatálního pacienta přineslo skóre v rozmezí 235-269 s průměrem, směrodatnou odchylkou a variačním koeficientem 255, 11,3 a 4,4 %. Negativní kontroly odhalily naprostou absenci obarveného materiálu.

Analytické pracovní charakteristiky

Analytické výsledky daných testů provedených na všech cílových strukturách potvrzují 100% citlivost, specifčnost a opakovatelnost.

Kat. č.	Popis produktu	Cíl	Specifičnost v rámci testu	Citlivost v rámci testu	Specifičnost mezi testy	Citlivost mezi testy
FBS25	Sůl Fast Blue RR	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
855	Alkalický roztok naftal AS-MX fosfátu	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
MHS1	Roztok hematoxylinu podle Mayera	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
854C	Koncentrovaný roztok citrátu	Místa aktivity	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3

Varování a rizika

Aktuální informace o rizicích, nebezpečích a bezpečnosti si přečtete v bezpečnostním listu a na označení výrobku.

85L1:



- H290 Může být korozivní pro kovy.
- H331 Toxický při vdechování.
- P234 Uchovávejte pouze v původním obalu.
- P261 Zamezte vdechování mlhy nebo výparů.
- P271 Používejte pouze venku nebo na dobře větraném místě.
- P304 + P340 + P311 PŘI VDECHNUTÍ: Odvedte postiženého na čerstvý vzduch a zajistěte mu pohodlné dýchání. Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.
- P390 Absorbujte rozlité tekutiny, abyste zabránili poškození materiálu.
- P403 + P233 Skladujte na dobře větraném místě. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou.

85L2:



- H290 Může být korozivní pro kovy.
- H319 Způsobuje vážné podráždění očí.
- H331 Toxický při vdechování.
- P234 Uchovávejte pouze v původním obalu.
- P261 Nevdechujte prach / dým / plyn / mlhu / výpary / aerosol.
- P264 Po manipulaci si důkladně omyjte pokožku.
- P271 Používejte pouze venku nebo na dobře větraném místě.
- P304 + P340 + P311 PŘI VDECHNUTÍ: Odvedte postiženého na čerstvý vzduch a zajistěte mu pohodlné dýchání. Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.
- P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyjmout. Pokračujte ve vyplachování.

Pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné nežádoucí příhodě, nahlase to výrobci a/nebo jeho autorizovanému zástupci a vašemu národnímu úřadu.

Definice symbolů

Symbody definované v normě EN ISO 15223-1:2021

	Výrobce		Katalogové číslo
	Přečtete si Návod k použití		Kód šarže
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii		Prohlášení o shodě s předpisy Evropské unie (podle definice v IVDR 2017/746)
	Datum spotřeby		Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Teplotní limit		Upozornění
	Datum výroby		Dovozce
	Označuje autorizovaného zástupce ve Švýcarsku		

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
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann NY Acad Sci 155:911, 1968
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6): 579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

Kontaktní informace

Chcete-li podat objednávku, navštivte naše webové stránky na [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Technický servis naleznete na stránkách technického servisu na naší webové stránce [SigmaAldrich.com/techservice](https://sigmaaldrich.com/techservice).

Historie revizí

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Přeneseno do nové šablony s aktuálním značením. Určeno pro profesionální použití v rámci určeného použití a bezpečnostních opatření. Revidované určené použití k dosažení souladu s pokyny IVDR. Aktualizovaný bezpečnostní list materiálu k bezpečnostnímu listu. Aktualizované kontaktní informace. Odstraněn pokyn k dodržení CLS1 pro odběr vzorků. Odstraněna norma EN 980 a změněna na normu EN ISO 15223-1:2021 pro symbody. Přidány kontaktní informace pro případ nežádoucí události. Odstraněna reference č. 4 a přechíslovány reference. Přidána tabulka historie revizí. Přidána doplňková věta o nebezpečnosti pro 854C-20ML a 855-20ML. Přidána varování a rizika. Přidány informace CH-REP.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Počáteční M a Sigma-Aldrich jsou ochranné známky společnosti Merck KGaA, Darmstadt, Německo nebo jejich přidružených společností. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách jsou k dispozici prostřednictvím veřejně přístupných zdrojů.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

Bruksanvisning

Leukocytt alkalisk fosfatase-sett

Prosedyre nr. 85



Tiltenkt bruk

Sigma-Aldrich alkalisk fosfatase-sett er ment å være en generell histologisk fargeløsning for bruk i et laboratorium. Alkalisk fosfatase-reagenser er bare for profesjonell "in vitro-diagnostisk bruk". Denne manuelle, kvantitative og histokjemiske prosedyren demonstrerer alkalisk fosfatase-aktivitet i leukocytt- eller benmargsfilmer fra mennesker. Histologisk visualisering av leukocytt-forbundet alkalisk fosfatase er en unik teknikk som ofte brukes innen medisin.

I 1929 foreslo Kay for første gang tilstedeværelsen av alkalisk fosfatase i leukocytt.¹ Det tok imidlertid mange år før Kaplow introduserte en praktisk fargemetode for å påvise leukocyttenzymet.² Kaplow brukte natrium- α -nafthylfosfat som substrat, Fast Blue RR som diazoniumsalt og anbefalte en skåringsmetode for semikvantitative sammenligninger.² Det ble også foreslått forbedringer som resulterte i god bevaring av cellemorfologi. α -nafthylfosfat ble deretter erstattet med naftol-AS-fosfat. Det er verdt å merke seg at det er funnet en god korrelasjon mellom cytokjemiske og biokjemiske teknikker for å analysere aktiviteten av alkalisk fosfatase i leukocytt (LAPA).³

Med Sigma-Aldrich-metoden blir alkalisk fosfatase i leukocytt bestemt i blod- eller benmargsfilmer etter at de er forsiktig festet til objektglass. De fikserte filmene inkuberes deretter i en løsning som inneholder naftol-AS-MX-fosfat. Som et resultat av fosfataseaktivitet blir naftol AS-MX frisatt og umiddelbart koblet til et diazoniumsalt, og danner et uøselig, synlig pigment på steder med fosfataseaktivitet.

Reagenser

Fast Blue RR-salt (kat.nr. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, forhåndsveide kapsler. Den faktiske vekten til hver kapsel varierer ut fra fargestoffparti, og har blitt optimert av analysen.

Alkalisk naftol-AS-MX-fosfatatløsning (kat.nr. 855-20ML)

Naftol-AS-MX-fosfat, 0,25 % (vekt/volum), bufret ved pH 8,6, 25 °C. Fare. Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Kan forårsake irritasjon av luftveiene. Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler. VED SVELGING: Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSENTER / en lege.

Mayers hematoksylinløsning (kat.nr. MHS1-100ML)

Hematoksylin, sertifisert, 1 g/l, C.I. 75290, natriumjodat, 0,2 g/l, aluminiumsammoniumhydroksid, 5 g/l og stabiliseringsmidler

Sitratkonsentratløsning (kat.nr. 854C-20ML)

Sitronsyre-natriumstrat, 1,5 mol/l. Fare. Irriterer huden. Gir alvorlig øyeskade. Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler. Kan forårsake irritasjon av luftveiene. Benytt vernehansker/øyevern/ansiktsvern.

Spesielle materialer som kreves, men som ikke medfølger

- Scotts konsentrat til kranvannserstatning, katalognr. S5134
- Aceton, ACS-reagens

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar Fast Blue RR-salt under 0 °C. Oppbevar alkalisk naftol-AS-MX-fosfatatløsning i kjøleskap (2–8 °C). Reagenser er stabile frem til utlopsdatoen.

Oppbevar Mayers hematoksylinløsning godt lukket i romtemperatur (18–26 °C) beskyttet mot lys. Løsningen må ikke helles tilbake i originalbeholderen etter bruk i en Coplin-beholder. Kasser når tiden som kreves for egnet farging overskrider tiden som er anbefalt i prosedyren med mer enn 5 minutter.

Oppbevar sitratkonsentratløsning i romtemperatur (18–26 °C). Oppbevar arbeidsløsning i kjøleskap (2–8 °C). Sitratløsninger er egnet for bruk ved fravær av mikrobiell vekst.

Fremstilling

Fast Blue RR-salt, alkalisk naftol-AS-MX-fosfatatløsning og Mayers hematoksylinløsning leveres klare til bruk i prosedyren.

Fremstill sitratarbeidsløsningen ved å fortynde 2 ml sitratkonsentratløsning med 100 ml avionisert vann.

For å fremstille fikseringsløsning (sitratbufret aceton, 60 %) varmer du opp sitratarbeidsløsning til romtemperatur (18–26 °C). Tilsett 2 volum med sitratarbeidsløsning i 3 volum aceton under konstant omrøring. Kasser etter bruk.

Scotts arbeidsløsning til kranvannserstatning fremstilles ved å fortynde 1 volum med Scotts konsentrat til kranvannserstatning med 9 volum med avionisert vann.

Forsiktighetsregler

IVD-ene inkludert i dette settet er beregnet for in vitro-diagnostisk bruk i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD-ene er kun for profesjonell bruk av kvalifisert personell. Sigma-Aldrich-IVD-er kan betjenes av laboratoriepersonell som er opplært i å håndtere humane prøver som kan være smittsomme, bruke mikroskoper og annet laboratorieutstyr og som har fargeoppfatning og synsskarphet for å skille farger og andre elementer under et mikroskop.

Normale forsiktighetsregler for håndtering av laboratoriereagenser bør følges. Avfall må kastes i samsvar med alle lokale, statlige, provinsielle eller nasjonale forskrifter.

Prosedyre

Prøvetaking

Ferske blod- eller benmargsfilmer eller prøver som er antikoagulert med heparin, kan brukes.⁴ UNNGÅ EDTA.⁴ Blodutstryk skal farges for enzymaktivitet innen 8 timer etter fremstilling. Hvis dette ikke er mulig, kan det gradvise tapet av alkalisk fosfatase-aktivitet forsinkes ved hjelp av fiksering og oppbevaring over natten i fryseren.⁴ Filmer skal tørkes minst 1 time før fiksering og 3 timer etter fiksering før nedfrysing.

Merknader

Det finnes lite data angående forbindelser som kan forstyrre aktiviteten av alkalisk fosfatase i leukocytt (LAPA). Visse legemidler og andre stoffer er kjent for å påvirke aktiviteten av sirkulerende alkalisk fosfatase.⁵ P-piller, kortisol og stress kan øke skårene av alkalisk fosfatase i leukocytt.⁶

Utfør prosedyren ved bruk av positive kontroller. Disse kan hentes fra pasienter med pyogen leukocytose eller hos gravide kvinner i tredje trimester eller de første dagene etter fødselen. Skår av alkalisk fosfatase i leukocytt fra disse personene er som regel over 100. En negativ kontroll kan fremstilles fra et vanlig fiksert utstryk ved å dyppe den i kokende vann i 1 minutt for å inaktivere enzymet. Kontrollfilmer kan bevares i opptil 1 år hvis de oppbevares fiksert, pakket i Parafilm® ved –70 °C. Disse filmene bør lufttørkes minst 1 time før fiksering og 3 timer etter fiksering før frysing.

Det anbefales sterkt at hvert laboratorium oppretter sitt eget forventede område som er karakteristisk for den lokale populasjonen.

Prosedyren avhenger av subjektiv vurdering av fargede celler. Dette kan resultere i at svært ulike variasjoner oppnås. Temperaturen på reaksjonsblandingen må holdes mellom 18–26 °C. Lavere temperaturer vil resultere i betydelig lavere skår. Over 30 °C øker aktiviteten betydelig. Eosinofiler farges ikke, men kan gjenkjennes av lappedelte kjerner og store refraktile granuler.

Prosedyre

1. Mål opp 48 ml destillert vann i en egnet beholder og juster temperaturen til 18–26 °C.
2. Fremstill diazoniumsaltløsning:
Løs opp innholdet i én Fast Blue RR-saltkapsel i destillert vann (fra trinn 1). En magnetrør kan være nyttig.
3. Tilsett 2 ml alkalisk naftol-AS-MX-løsning i fortyntet diazoniumsaltløsning (fra trinn 2). Bland.
4. Romtemperer (18–26 °C) fikseringsløsningen. Fikser objektglass ved å senke dem ned i fikseringsløsning i 30 sekunder. Skyll varsmot i avionisert vann i 45 sekunder. Objektglassene skal ikke lufttørkes.
5. Plasser objektglassene i alkalisk fargestoffblanding (fra trinn 3) og inkuber ved 18–26 °C i 30 minutter. Bløtlagte objektglass skal beskyttes mot direkte lys. Kasser den alkaliske fargestoffblandingen etter bruk.
6. Etter 30 minutter, fjern objektglassene og skyll grundig i avionisert vann i 2 minutter. Objektglassene skal ikke lufttørkes.
7. Legg objektglassene i Mayers hematoksylinløsning i 10 minutter.
8. Skyll de kontrastfargede objektglassene i 3 minutter i avionisert vann. Dette vil resultere i rød fiolett kjernefarging.
9. Evaluer mikroskopisk. Hvis dekkglass kreves, må du kun bruke et vannholdig monteringsmedium.

Ytelseegenskaper

Skåringsmetode

Skann filmen (900X) og velg et tynt område der erythrocytter så vidt berører hverandre. Steder med fosfataseaktivitet vises som blå granuler. Velg 100 påfølgende segmenterte og båndformede nøytrofile granulocytt. Gi vurdering fra 0 til 4+ på grunnlag av mengde og intensitet av utfelt fargestoff i cytoplasmaet til disse cellene. Se tabell 1 for skåringsegenskaper. Summen av vurderinger fra 100 celler anses som skåren.

Tabell 1. Skåringsegenskaper*

Cellevurdering	Utfelt azofargestoff i cytoplasma			Bakgrunn for cytoplasma
	Mengde** (%)	Granulørstørrelse	Fargeintensitet	
0+	Ingen	-	Ingen	Ingen
1+	50	Liten	Svak til moderat	Fargeløs til svært lys blå
2+	50–80	Liten	Moderat til sterk	Fargeløs til lys blå
3+	80–100	Middels til stor	Sterk	Fargeløs til blå
4+	100	Middels til stor	Strålende	Usynlig

* Tabell 1 representerer endring av observasjoner gjort av Kaplow.^{2,3}

** Prosentandel cytoplasmavolum som er okkupert av azofargestoffutfelling.

For å oppnå skår for alkalisk fosfatase-aktivitet i leukocytt (LAPA) multipliseres antallet celler med verdien for cellevurdering. Disse tallene legges til for å oppnå LAPA-skår som vist i følgende eksempler:

Cellevurdering	Skår etter telling	LAPA-skår
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totalt	100	67

Forventede verdier

Følgende skår ble oppnådd hos Sigma-Aldrich hos 20 normale personer. Blod ble samlet inn i hepariniserte rør og filmer ble fremstilt innen én time.

Fast Blue RR	
LAPA-gjennomsnitt $\pm$ 1SD	96 $\pm$ 44
LAPA-område	52–140

Følgende skårområde ble oppnådd fra disse 20 normale personene:

Fast Blue RR
32–182

Hvis observerte resultater avviker fra forventede resultater, kontakt Teknisk service hos Sigma-Aldrich for å få hjelp.

Forventede observasjoner

Hos mennesker er aktiviteten av alkalisk fosfatase begrenset til modne og båndformede granulocytter. Noen ganger kan svak farging observeres i lymfocytter. Benmargosteoblaster og endotelceller farges kraftig.

En serie objektglass ble klargjort ved bruk av blod fra normale forsøkspersoner, kvinner i siste trimester av svangerskapet, pasienter tidlig postpartum og personer som viste en leukemoid reaksjon. Negative kontroller ble fremstilt ved varmeinaktivering som beskrevet. Ulike kombinasjoner av Fast Blue RR og kontrastfarger (metylenblått-løsning og Mayers hematoksylinløsning) ble utført i replikat, og LAPA-skåring ble innhentet. Verdiene som ble oppnådd på flere fremstilte objektglass for hver pasient, var nært overensstemmende og tilsynelatende ikke påvirket av den anvendte fargings-/kontrastfargingsteknikken. For eksempel ga 7 utstryk fremstilt med blod fra en prenatal pasient skår fra 235–269 med et gjennomsnittlig standardavvik og variasjonskoeffisient på henholdsvis 255, 11,3 og 4,4 %. Negative kontroller viste fullstendig fravær av farget materiale.

Analytiske ytelsesegenskaper

De analytiske ytelsesresultatene for de gitte testene utført på alle målstrukturer bekrefter 100 % følsomhet, spesifisitet og repeterbarhet.

Kat. nr.	Produkt-beskrivelse	Mål	Spesifisitet innen analyse	Følsomhet innen analyse	Spesifisitet mellom analyser	Følsomhet mellom analyser
FBS25	Fast Blue RR-salt	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
855	Alkalisk naftol-AS-MX-fosfatløsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
MHS1	Mayers hematoksylinløsning	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
854C	Sitratkonsentrat-løsning	Steder med aktivitet	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Advarsler og farer

Se sikkerhetsdatablad og produktmerking for oppdatert risiko-, fare- eller sikkerhetsinformasjon.

85L1:



H290 Kan være etsende for metaller.

H331 Giftig ved innånding.

P234 Oppbevares bare i originalemballasjen.

P261 Unngå innånding av tåke eller damp.

P271 Brukes bare utendørs eller i et godt ventilert område.

P304 + P340 + P311 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

P390 Absorber spill for å hindre materiell skade.

P403 + P233 Oppbevares på et godt ventilert sted. Hold beholderen tett lukket.

85L2:



H290 Kan være etsende for metaller.

H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.

H331 Giftig ved innånding.

P234 Oppbevares bare i originalemballasjen.

P261 Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.

P264 Vask huden grundig etter bruk.

P271 Brukes bare utendørs eller i et godt ventilert område.

P304 + P340 + P311 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

Hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av denne enheten eller som et resultat av bruken, rapporter det til produsenten og/eller produsentens autoriserte representant og til din nasjonale myndighet.

Symbolforklaring

Symboler som definert i EN ISO 15223-1:2021

	Produsent		Katalognummer
	Se bruksanvisning		Batchkode
	Autorisert representant i Det europeiske fellesskap / EU		EU-samsvarserklæring (definert i IVDR 2017/746)
	Best før-dato		In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr
	Temperaturgrense		Forsiktighetsregel
	Produksjonsdato		Importør
	Angir autorisert representant i Sveits		

Referanser

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Kontaktinformasjon

For å legge inn en bestilling, besøk nettstedet vårt på [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Besøk siden for teknisk service på nettstedet vårt på [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice) for teknisk service.

Revisjonshistorikk

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Overførte til ny mal med gjeldende varemerke. Spesifiserte at utstyret er for profesjonell bruk, i tiltenkt bruk og forsiktighetsregler. Reviderte tiltenkt bruk for å overholde IVDR-retningslinjer. Oppdaterte materialsikkerhetsdatablad til sikkerhetsdatablad. Oppdaterte kontaktinformasjon. Fjernet instruksjon om å følge CLSI for prøvetaking. Fjernet EN 980 og endret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. La til kontaktinformasjon for bivirkninger. Fjernet referanse nr. 4 og omnummererte referansene. La til en tabell med revisjonshistorikk. La til ytterligere faresetning for 854C-20ML og 855-20ML. La til advarsler og farer. La til informasjon om CH-REP.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

Initialen M og Sigma-Aldrich er varemerker for Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dets tilknyttede selskaper. Alle andre varemerker tilhører sine respektive eiere. Detaljert informasjon om varemerker er tilgjengelig via offentlig tilgjengelige ressurser.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Kullanma Talimatı

Lökosit Alkalın Fosfataz Kiti

Prosedür No. 85



Kullanım Amacı

Sigma-Aldrich Alkalın Fosfataz kitleri genel laboratuvar kullanımı için histolojik boya olarak tasarlanmıştır. Alkalın Fosfataz reaktifleri yalnızca profesyonel "In Vitro Tanı Amaçlı Kullanım" içindir. Bu manuel, kalitatif, histokimyasal prosedür, insan kanı veya kemik iliği filmlerinin lökositlerinde, alkalın fosfataz aktivitesini gösterir. Lökositle bağlantılı alkalın fosfatazın histolojik olarak görselleştirilmesi, şu anda tıpta yaygın olarak kullanılan benzersiz bir tekniktir.

1929'da Kay, ilk olarak lökositlerde alkalın fosfatazın varlığını öne sürmüştür.¹ Bununla birlikte Kaplow, lökosit enzimini göstermek için pratik bir boyama yöntemini ancak yıllar sonra ortaya koymuştur.² Kaplow, substrat olarak sodyum α-naftil fosfat, diazonyum tuzu olarak hızlı mavi RR kullanmış ve yarı niceliksel karşılaştırmalar için bir skorlama yöntemi önermiştir.² Ayrıca, hücresel morfolojinin iyi bir şekilde korunmasını sağlayan iyileştirmeler de önerilmiştir. Daha sonra α-naftil fosfat, naftol AS fosfat ile değiştirilmiştir. Lökosit alkalın fosfat aktivitesini (LAPA) test etmek için sitokimyasal ve biyokimyasal teknikler arasında iyi bir korelasyon bulunması dikkat çekicidir.³

Sigma-Aldrich yöntemi ile, lamlara hafifçe fiks edildikten sonra kan veya kemik iliği filmlerinde lökosit alkalın fosfataz belirlenir. Fiksasyon uygulanmış filmler daha sonra naftol AS-MX fosfat içeren bir çözelti içinde inkübe edilir. Fosfataz aktivitesinin bir sonucu olarak, naftol AS-MX serbest kalır ve hemen bir diazonyum tuzu ile birleşerek fosfataz aktivitesinin olduğu yerlerde çözünmez, görünür bir pigment oluşturur.

Reaktifler

Hızlı Mavi RR Tuzu (Kat. No. FBS25-10CAP)

Hızlı Mavi, C.I. 37155, önceden tartılmış kapsüller. Kapsül başına gerçek ağırlık, boya partisine göre değişecektir ve test yardımı ile optimize edilmiştir.

Naftol AS-MX Fosfat Alkalın Çözeltisi (Kat. No. 855-20ML)

Naftol AS-MX fosfat, %0,25 (a/h), 25°C'de pH 8,6'da tamponlanmış. Tehlike. Cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz tahrişine neden olur. Solunum tahrişine neden olabilir. Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının. YUTULMASI HALİNDE: Derhal bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ veya doktoru/hekimi arayın.

Mayer Hematoksilen Çözeltisi (Kat. No. MHS1-100ML)

Hematoksilen, sertifikalı, 1 g/L, C.I. 75290, sodyum iyodat, 0,2 g/L, alüminyum amonyum hidroksit, 5 g/L ve stabilizatörler.

Sitrat Konsantresi Çözeltisi (Kat. No. 854C-20ML)

Sitrik asit-sodyum sitrat, 1,5 mol/L. Tehlike. Cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz hasarına neden olur. Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının. Solunum tahrişine neden olabilir. Koriyucu eldiven/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

Sağlanmayan Gerekli Özel Malzemeler

- Scott musluk suyu ikame konsantresi, Katalog No. S5134
- Aseton, ACS reaktifi

Saklama ve Stabilite

Hızlı Mavi RR Tuzu 0°C'nin altında saklayın. Naftol AS-MX Fosfat Alkalın Çözeltisini buzdolabında (2–8°C) saklayın. Reaktifler, son kullanma tarihine kadar stabildir.

Mayer Hematoksilen Çözeltisini oda sıcaklığında (18–26°C) kapağı ağız sıkıca kapalı, ışıktan koruyarak saklayın. Coplin kavanozunda kullandıktan sonra çözeltiyi orijinal kabına geri koymayın. Uygun boyama için gereken süre prosedürde tavsiye edilen süreyi 5 dakikadan fazla aşarsa atın.

Sitrat Konsantre Çözeltisini oda sıcaklığında (18–26°C) saklayın. Sitrat Çalışma Çözeltisini buzdolabında (2–8°C) saklayın. Sitrat çözeltileri, görünür mikrobiyal büyümenin olmadığı durumlarda kullanıma uygundur.

Hazırlama

Hızlı Mavi RR Tuzu, Naftol AS-MX Fosfat Alkalın Çözeltisi ve Mayer Hematoksilen Çözeltisi prosedürde kullanıma hazır olarak sunulur.

2 mL Sitrat Konsantre Çözeltisini deiyonize su ile 100 mL'ye seyrelterek Sitrat Çalışma Çözeltisi hazırlayın.

Fiksatif Çözelti (sitrat tamponlu asetona, %60) hazırlamak için Sitrat Çalışma Çözeltisini oda sıcaklığında (18–26°C) ısıtın. Sürekli karıştırarak, 3 ölçü asetona 2 ölçü Sitrat Çalışma Çözeltisi ekleyin. Kullanımdan sonra atın.

Scott Musluk Suyu İkame Çalışma Çözeltisi, 1 ölçü Scott Musluk Suyu İkame Konsantresini 9 ölçü deiyonize su ile seyrelterek hazırlanır.

Önemler

Bu IVD'ler, klinik laboratuvar ortamında in vitro tanı amaçlı kullanıma yöneliktir. Bu IVD'ler yalnızca kalifiye personel tarafından profesyonel kullanım içindir. Sigma-Aldrich IVD'ler, bulaşıcı olabilen insan numunelerini işlemek, mikroskop ve diğer laboratuvar ekipmanlarını kullanmak üzere eğitilmiş, renkleri ve mikroskop altında diğer nesneleri ayırt etmek için renk algısına ve görme keskinliğine sahip laboratuvar personeli tarafından kullanılabilir.

Laboratuvar reaktiflerini kullanırken uygulanan normal önlemlere uyulmalıdır. Atıkları tüm yerel, eyalet, il veya ulusal seviyedeki yönetmeliklere uygun olarak atın.

Prosedür

Numune Toplama

Taze kan veya kemik iliği filmleri veya heparin ile antikoagüle edilmiş numuneler kullanılabilir.⁴ EDTA'dan UZAK DURUN.⁴ Kan smear'ları, hazırlandıktan sonra 8 saat içinde enzim aktivitesi için boyanmalıdır. Fakat bu mümkün değilse, alkalın fosfataz aktivitesinin kademeli kaybı, fiksasyon ve gece boyunca dondurucuda saklama ile geciktirilebilir.⁴ Filmler fiksasyondan en az 1 saat önce ve fiksasyondan en az 3 saat sonra dondurulmadan önce kurutulmalıdır.

Notlar

Lökosit alkalın fosfataz aktivitesine (LAPA) müdahale edebilecek bileşiklerle ilgili bir veri eksikliği vardır. Bazı ilaçların ve diğer maddelerin dolaşımdaki alkalın fosfataz aktivitesini etkilediği bilinmektedir.⁵ Oral kontraseptifler, kortizol ve stres lökosit alkalın fosfataz skorlarının yükselmesine neden olabilir.⁶

Pozitif kontroller kullanarak prosedürü gerçekleştirin. Bunlar, piyojenik lökositozu olan hastalardan veya gebeliğin üçüncü trimesterindeki veya doğumdan sonraki ilk birkaç gündeki kadınlardan elde edilebilir. Bu kişilerin lökosit alkalı fosfataz skorları genellikle 100'ü geçer. Negatif kontrol, enzimi inaktive etmek için normal bir fiksasyon uygulanmış smear'ı 1 dakika kaynar suya batırarak hazırlanabilir. Kontrol filmleri, –70°C'de Parafilm®'e sarılarak fiksasyon uygulanmış şekilde muhafaza edilirse 1 yıla kadar saklanabilir. Bu filmler, fiksasyondan en az 1 saat önce ve fiksasyondan 3 saat sonra dondurulmadan önce hava ile kurutulmalıdır.

Her laboratuvarın, yerel popülasyon için karakteristik olan kendi beklenen aralığını oluşturması şiddetle tavsiye edilir.

Prosedür, boyanmış hücrelerin subjektif derecelendirmesine bağlıdır. Bu, elde edilen derecelendirmelerin geniş bir varyasyona sahip olmasına neden olabilir. Reaksiyon karışımının sıcaklığı 18–26°C arasında tutulmalıdır. Daha düşük sıcaklıklar önemli ölçüde daha düşük skorlarla sonuçlanacaktır. 30°C'nin üzerinde, aktivitede belirgin artışlar meydana gelir. Eozinofiller boyanmazlar ancak iki loblu çekirdekler ve büyük kırılgranüller tarafından bağlanabilirler.

Prosedür

1. Uygun bir kaba 48 mL distile su koyun ve sıcaklığı 18–26°C'ye ayarlayın.
2. Diazonyum tuzu çözeltisini hazırlayın: Bir Hızlı Mavi RR Tuz kapsülünün içeriğini distile suda çözün (Adım 1'deki). Bir manyetik karıştırıcı yardımcı olabilir.
3. Seyreltilmiş diazonyum tuzu çözeltisine (Adım 2'deki) 2 mL Naftol AS-MX Fosfat Alkalın Çözeltisi ekleyin. Karıştırın.
4. Fiksatif Çözeltiyi oda sıcaklığına (18–26°C) getirin. Fiksatif Çözeltiyi daldırarak lamlara 30 saniye fiksasyon uygulayın. Deiyonize suda 45 saniye hafifçe durulayın. Lamların kurumasına izin vermeyin.
5. Lamları alkalın boya karışımına ekleyin (Adım 3'teki) ve 18–26°C'de 30 dakika inkübe edin. Daldırılmış lamları doğrudan ışıktan koruyun. Kullandıktan sonra alkalın-boya karışımını atın.
6. 30 dakika sonra lamları çıkarın ve 2 dakika deiyonize suda iyice durulayın. Lamların kurumasına izin vermeyin.
7. Lamları 10 dakika boyunca Mayer Hematoksilen Çözeltisine yerleştirin.
8. Zıt boyalı lamları 3 dakika deiyonize suda durulayın. Bu kırmızı-viyole nükleer boyama ile sonuçlanacaktır.
9. Mikroskopik olarak değerlendirin. Lamel gerekiyorsa, yalnızca sulu bir yerleştirme ortamı kullanın.

Performans Özellikleri

Skorlama Yöntemi

Filmi tarayın (900X) ve eritrositlerin az temas ettiği ince bir alan seçin. Fosfataz aktivite bölgeleri mavi granüller olarak görünecektir. 100 ardışık segmentli ve bant şeklinde nötrofilik granülositleri seçin. Bu hücrelerin sitoplazmasında çökelen boyanın miktarı ve yoğunluğu temelinde 0 ila 4+ arasında derecelendirin. Skorlama özellikleri için Tablo 1'e bakın. 100 hücrenin derecelendirmelerinin toplamı skor olarak kabul edilir.

Tablo 1. Skorlama Özellikleri*

Sitoplazmada Çökeltilmiş Azo Boyası				
Hücre Derecelendirmesi	Miktar** (%)	Granül Boyutu	Boyama Yoğunluğu	Sitoplazmanın Arka Planı
0+	Yok	-	Yok	Yok
1+	50	Küçük	Silik ila Orta	Renksiz ila çok soluk mavi
2+	50-80	Küçük	Orta ila Güçlü	Renksiz ila soluk mavi
3+	80-100	Orta ila Büyük	Güçlü	Renksiz ila mavi
4+	100	Orta ila Büyük	Parlak	Görünmüyor

* Tablo 1, Kaplow tarafından yapılan gözlemlerin modifikasyonunu temsil etmektedir.^{2,3}

** Azo boya çöktelisinin kapladığı sitoplazma hacminin yüzdesidir.

Lökosit alkalın fosfataz aktivite (LAPA) skorunu elde etmek için hesaplanan hücre sayısı, hücre derecelendirme değeri ile çarpılır. Bu rakamlar, aşağıdaki örneklerde gösterildiği gibi LAPA skorunu elde etmek için toplanır:

Hücre Derecelendirmesi	Hesaplanan Skor	LAPA Skoru
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Toplam	100	67

Beklenen Değerler

Sigma-Aldrich'te 20 normal birey için aşağıdaki skorlar elde edilmiştir. Kan heparinize tüplere alındı ve bir saat içinde filmler hazırlanmıştır.

Hızlı Mavi RR	
LAPA Ortalama ±1 SD	96±44
LAPA Aralığı	52-140

Bu 20 normal bireyden aşağıdaki skor aralıkları elde edilmiştir:

Hızlı Mavi RR	
	32-182

Gözlemlenen sonuçlar beklenen sonuçlardan farklıysa, yardım için lütfen Sigma-Aldrich Teknik Servisi ile iletişime geçin.

Beklenen Gözlemler

İnsanlarda alkalın fosfataz aktivitesi, olgun ve bant şeklindeki granüositlerle sınırlıdır. Nadiren lenfositlerde zayıf boyanma gözlemlenir. Kemik iliği osteoblastları ve endotel hücreleri güçlü bir şekilde boyanır.

Normal kişilerden, gebeliğin son üç ayındaki kadınlardan, doğum sonrası erken dönemdeki hastalardan ve lökoid reaksiyon sergileyen bireylerden alınan kan kullanılarak bir dizi lam hazırlanmıştır. Negatif kontroller, tarif edildiği gibi ısı inaktivasyonu yoluyla hazırlanmıştır. Hızlı Mavi RR ve zıt boyaların (Metilen Mavisi Çözeltisi ve Mayer Hematoksisilen Çözeltisi) çeşitli kombinasyonları tekrar tekrar gerçekleştirilmiş ve LAPA skorlanmıştır. Her gönüllü için hazırlanan birden çok lamdan elde edilen değerler yakın uyum içindeydi ve kullanılan boyama/zıt boyama tekniğinden etkilenmiş gibi görünmüyordu. Örneğin, doğum öncesi bir hastadan alınan kan kullanılarak yapılan 7 smear, sırasıyla %255, %11,3 ve %4,4 ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı ile 235-269 arasında değişen skorlar vermiştir. Negatif kontroller, boyalı materyalin tamamen eksikliğini ortaya çıkarmıştır.

Analitik Performans Özellikleri

Tüm hedef yapılar üzerinde yürütülen belirli testlere ait analitik performans sonuçları %100 duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliği doğrulamaktadır.

Kat. No.	Ürün Tanımı	Hedef	Tahliil İçi Özgüllük	Tahliil İçi Duyarlılık	Tahliiller Arası Özgüllük	Tahliiller Arası Duyarlılık
FBS25	Hızlı Mavi RR Tuzu	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
855	Naftol AS-MX Fosfat Alkalın Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
MHS1	Mayer Hematoksisilen Çözeltisi	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
854C	Sitrat Konsantre Çözeltisi	Aktivite Bölgeleri	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3

Uyarılar ve Tehlikeler

Güncellenmiş herhangi bir risk, tehlike veya güvenlik bilgisi için Güvenlik Veri Formuna ve ürün etiketine bakın.

85L1:

H290 Metaller için aşındırıcı olabilir.

H331 Solunması durumunda toksiktir.

P234 Yalnızca orijinal ambalajının içinde saklayın.

P261 Sisini veya buharını solumayın.

P271 Sadece dışarıda veya iyi havalandırılan bir alanda kullanın.

P304 + P340 + P311 SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahatça nefes alabileceği bir durumda tutun. Bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P390 Maddi hasarı önlemek için sıvı döküntüleri temizleyin.

P403 + P233 İyi havalandırılan bir yerde saklayın. Kapağı sıkıca kapalı olarak tutun.

85L2:

H290 Metaller için aşındırıcı olabilir.

H319 Ciddi göz tahrişine neden olur.

H331 Solunması durumunda toksiktir.

P234 Yalnızca orijinal ambalajının içinde saklayın.

P261 Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.

P264 Elleçlemeden sonra cildinizi iyice yıkayın.

P271 Sadece dışarıda veya iyi havalandırılan bir alanda kullanın.

P304 + P340 + P311 SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahatça nefes alabileceği bir durumda tutun. Bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımı sonucunda ciddi bir olay meydana gelirse, lütfen bunu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makamınıza bildirin.

Sembol Tanımları

EN ISO 15223-1:2021'de tanımlanan semboller

	Üretici		Katalog Numarası
	Kullanma Talimatına bakın		Parti Kodu
	Avrupa Topluluğu'nda/Avrupa Birliği'nde Yetkili Temsilci		Avrupa Birliği Uygunluk Beyanı (IVDR 2017/746'da tanımlanmıştır)
	Son Kullanma Tarihi		İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Sıcaklık Sınırı		Dikkat
	Üretim Tarihi		İthalatçı
	İsviçre'deki Yetkili Temsilciyi Belirtir		

Referanslar

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

İletişim Bilgileri

Sipariş vermek için lütfen [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com) adresinden web sitemizi ziyaret edin. Teknik Servis için lütfen [SigmaAldrich.com/techservice](mailto:techservice@sigmaaldrich.com) adresinden web sitemizin teknik servis sayfasını ziyaret edin.

Revizyon Geçmişi

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Mevcut markalama ile yeni şablona aktarıldı. Kullanım amacı ve önlemler bölümünde profesyonel kullanım amaçlı olduğu belirtildi. Kullanım amacı, IVDR yönergelerine uyumlu şekilde revize edildi. Malzeme Güvenlik Bilgi Formu, Güvenlik Bilgi Formu olarak güncellendi. İletişim bilgileri güncellendi. Numune toplama için CLS1'yi takip etme talimatı kaldırıldı. Semboller için EN 980 kaldırıldı ve EN ISO 15223-1:2021 olarak değiştirildi. Advers olay iletişim bilgileri eklendi. 4 numaralı referans kaldırıldı ve referanslar yeniden numaralandırıldı. Bir revizyon geçmişi tablosu eklendi. 854C-20ML ve 855-20ML için ek tehlike uyarısı eklendi. Uyarılar ve Tehlikeler eklendi. İsviçre'deki yetkili temsilci bilgileri eklendi.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M ve Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Almanya veya bağlı kuruluşlarının ticari markalarıdır. Diğer tüm ticari markalar ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir. Ticari markalar hakkında ayrıntılı bilgi, herkesin erişebileceği kaynaklar aracılığıyla edinilebilir.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Käyttöohje

Leukosyyttien alkalisen fosfataasin pakkaus

Menetelmänro 85



Käyttötarkoitus

Sigma-Aldrichin alkalisen fosfataasin pakkaus on tarkoitettu histologiseen värjäykseen yleisessä laboratoriotiokäytössä. Alkaliset fosfataasireagenssit on tarkoitettu vain ammatikikäyttöön ”in vitro -diagnostiikassa”. Tämä manuaalinen, kvalitatiivinen, histokemiallinen menetelmä osoittaa alkalisen fosfataasin toiminnan ihmisen veren tai luuytimen siveilyvalmisteliden leukosyyteissä. Leukosyytteihin liittyvän alkalisen fosfataasin histologisen visualisointi on ainutlaatuinen tekniikka, joka on nykylläketieteessä yleisessä käytössä.

Vuonna 1929 Kay ehdotti ensimmäisenä alkalisen fosfataasin esiintymistä leukosyyteissä.¹ Meni kuitenkin monta vuotta, ennen kuin Kaplow esitteli käytännöllisen värjäysmenetelmän leukosyyttientsymien osoittamiseksi.² Kaplow käytti natrium- α -naftyylifosfaattia substraattina ja nopeaa sini-RR:ää diatsoniumsuoalana ja suositteli pisteytysmenetelmää semikvantitatiiviseen vertailuun.² Hän ehdotti myös parannuksia, jotka paransivat solurakenteen säilymistä. Myöhemmin α -naftyylifosfaatti korvattiin naftoli-AS-fosfaattilla. Huomattavaa on, että sytokemiallisten ja biokemiallisten teknikoiden välillä on havaittu hyvä korrelaatio leukosyyttien alkalisen fosfaatin toiminnan (LAPA) määrittämisessä.³

Sigma-Aldrichin menetelmällä leukosyyttien alkalinen fosfataasi määritetään veren tai luuytimen siveilynäytteestä sen jälkeen, kun ne on varovasti kiinnitetty objektilaseihin. Sen jälkeen kiinnitetyt siveilyvalmisteita inkuboidaan naftoli-AS-MX-fosfaattia sisältävässä liuoksessa. Fosfataasitoiminnan seurauksena naftoli-AS-MX vapautuu ja kytkeytyy välittömästi diatsoniumsuoalan muodostaen liukenemattoman, näkyvän pigmentin fosfataasitoiminnan alueilla.

Reagenssit

Nopea sini-RR-suola (luettelonro FBS25-10CAP)

Nopea sini, väri-indeksi 37155, esipunnittu kapselit. Kapselin todellinen paino vaihtelee väriaine-erän mukaan, ja se on optimoitu määrittämisessä.

Alkalinen naftoli-AS-MX-fosfaattiliuos (luettelonro 855-20ML)

Naftoli-AS-MX-fosfaatti, 0,25 % (w/v), puskuroitu pH-arvolla 8,6, 25 °C. Vaara. Ärsyttää ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota välittömästi yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin.

Mayerin hematoksyyliiniliuos (luettelonro MHS1-100ML)

Hematoksyliini, sertifioitu, 1 g/l, väri-indeksi 75290, natriumjodaatti, 0,2 g/l, alumiiniammoniumhydroksidi, 5 g/l ja stabilointiaineet

Sitraattikonsentraattiliuos (luettelonro 854C-20ML)

Sitruunahapponatriumsitraatti, 1,5 mol/l. Vaara. Ärsyttää ihoa. Voimakkaasti silmiä vaurioittavaa. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Käytä suojakäsineitä/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

Tarvittavat erityismateriaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

- Scottin vesijohtovedenkorvikkeen konsentraatti, luettelonro S5134
- Asetoni, ACS-reagenssi

Säilytys ja stabiilius

Säilytä nopea sini-RR-suola alle 0 °C:ssa. Säilytä alkalinen naftoli-AS-MX-fosfaattiliuos jääkaapissa (2–8 °C). Reagenssit ovat stabiileja viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Säilytä Mayerin hematoksyyliiniliuos tiiviisti suljetuna huoneenlämmössä (18–26 °C) valolta suojattuna. Älä palauta liuosta alkuperäiseen pakkaukseen, kun sitä on käytetty Coplin-astiassa. Hävitä liuos, kun soveltuvaan värjäykseen kuluva aika ylittää menetelmässä suositellun ajan yli viidellä minuutilla.

Säilytä sitraattikonsentraattiliuos huoneenlämmössä (18–26 °C). Säilytä sitraattityöskentelyliuos jääkaapissa (2–8 °C). Sitraattiliuokset soveltuvat käytettäväksi, kun mikrobikasvua ei ole.

Valmistelu

Nopea sini-RR-suola, alkalinen naftoli-AS-MX-fosfaattiliuos ja Mayerin hematoksyyliiniliuos toimitetaan valmiina käytettäviksi menetellessä.

Valmistele sitraattityöskentelyliuos laimentamalla 2 ml sitraattikonsentraattiliuosta 100 ml:lla deionisoitua vettä.

Lämmitä sitraattityöskentelyliuos huoneenlämpöiseksi (18–26 °C) fiksatiiviliuoksen (sitraatti ja puskuroitu aseton, 60 %) valmistamista varten. Lisää kaksi tilavuusosaa sitraattityöskentelyliuosta kolmeen tilavuusosaan asetonia koko ajan sekoittaen. Hävitä käytön jälkeen.

Scottin vesijohtovedenkorvikkeen työskentelyliuos valmistetaan laimentamalla yksi tilavuusosa Scottin vesijohtovedenkorvikkeen konsentraattia yhdeksällä tilavuusosalla deionisoitua vettä.

Varotoimet

Nämä in vitro -diagnostiset (IVD) laitteet on tarkoitettu käytettäväksi ”in vitro -diagnostiikassa” kliinisessä laboratorioympäristössä. Nämä IVD-laitteet on tarkoitettu vain pätevän ammattihenkilöstön käyttöön. In vitro -diagnostisia Sigma-Aldrich-laitteita saa käyttää laboratoriohenkilöstö, joka on koulutettu käsittelemään mahdollisesti tartuntavaarallisia ihmispersäisiä näytteitä ja käyttämään mikroskooppia ja muita laboratoriotarvikkeita ja jolla on riittävä värinäkö ja näöntarkkuus värien ja muiden kohteiden erottamiseen mikroskooppilla.

Normaaleja laboratorioreagenssien käsittelyyn liittyviä varotoimia tulee noudattaa. Hävitä jätteet kaikkien paikallisten, alueellisten ja kansallisten määräysten mukaisesti.

Menettely

Näytteenotto

Tuoreita veren tai luuytimen siveilyvalmisteita tai hepariiniilla antikoaguloituja näytteitä voidaan käyttää.⁴ VÄLTÄ EDTA:TA.⁴ Veren siveilynäytteet on värjättävä entsyymitoiminnan selvittämiseksi kahdeksan tunnin kuluessa valmistelusta. Jos tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, alkalisen fosfataasitoiminnan asteittaista häviämistä voidaan viivästyttää kiinnittämällä näyte ja säilyttämällä sitä pakastimessa yön yli.⁴ Siveilyvalmisteita on kuivattava vähintään tunti ennen kiinnittämistä ja kolme tuntia kiinnittämisen jälkeen ennen jäädyttämistä.

Huomautukset

Tietoa leukosyyttien alkalisen fosfataasin toimintaa (LAPA) mahdollisesti häiritsevästä yhdisteistä on niukasti. Tietytjen lääkkeiden ja muiden aineiden tiedetään vaikuttavan kiertävän alkalisen fosfataasin toimintaan.⁵ Suun kautta otettavat ehkäisyvalmisteet, kortisoli ja stressi voivat johtaa suurempiin leukosyyttien alkalisen fosfataasin pisteisiin.⁶

Käytä menetellessä positiivisia kontrolleja. Niitä voidaan ottaa potilailta, joilla on pyogeeninen leukosytoosi, tai naisilta, jotka ovat raskauden kolmannella kolmanneksella tai synnyttäneet muutama päivä sitten. Näiden henkilöiden leukosyyttien alkalisen fosfataasin pisteet ovat yleensä yli 100. Negatiivinen kontrolli voidaan valmistaa normaalista kiinnitetystä siveilynäytteestä upottamalla se kiehuvaan veteen yhden minuutin ajaksi, jolloin entsyymi inaktivoituu. Kontrollisiveilyvalmisteita voidaan säilyttää jopa vuoden ajan, jos ne säilytetään kiinnitettynä ja Parafilm®-kääreessä –70 °C:ssa. Näiden siveilyvalmisteliden on annettava kuivua vähintään tunti ennen kiinnittämistä ja kolme tuntia kiinnittämisen jälkeen ennen jäädyttämistä.

On erittäin suositeltavaa, että jokainen laboratorio määrittää oman odotetun alueensa, joka on ominainen paikalliselle väestölle.

Menetelmä on riippuvainen värjättyjen solujen subjektiivisesta arvioinnista. Tämä voi johtaa arvioiden laajaan vaihteluun. Reaktioseoksen lämpötila on pidettävä välillä 18–26 °C. Alhaisemmat lämpötilat johtavat huomattavasti pienempiin pisteisiin. Yli 30 °C:n lämpötilassa toiminta lisääntyy merkittävästi. Eosinofiilit eivät värjäydy, mutta ne voidaan tunnistaa kaksilohkoisista tumista ja suurista heijastavista granulista.

Menettely

- Mittaa 48 ml tislattua vettä sopivaan astiaan ja säädä lämpötilaksi 18–26 °C.
- Valmistele diatsoniumsuoalaliuos:
Liuota yhden nopeaa sini-RR-suola sisältävän kapselin sisältö tislattuun veteen (valmisteltu vaiheessa 1). Apuna voi käyttää magneettisekoitinta.
- Lisää 2 ml alkalista naftoli-AS-MX-liuosta laimennettuun diatsoniumsuoalaliuokseen (valmistettu vaiheessa 2). Sekoita.
- Anna fiksatiiviliuoksen tasaantua huoneenlämpöön (18–26 °C). Kiinnitä objektilasit upottamalla ne fiksatiiviliuokseen 30 sekunniksi. Huuhtelevä varovasti deionisoidussa vedessä 45 sekunnin ajan. Älä päästä objektilaseja kuivumaan.
- Lisää objektilaseja alkaliseen värioseokseen (valmistettu vaiheessa 3) ja inkuboi 18–26 °C:ssa 30 minuutin ajan. Suojaa upotetut objektilasit suoralta valolta. Hävitä alkalinen värioseos käytön jälkeen.
- Poista objektilasit 30 minuutin kuluttua ja huuhtelevä huolellisesti deionisoidulla vedellä vähintään kahden minuutin ajan. Älä päästä objektilaseja kuivumaan.
- Aseta objektilasit Mayerin hematoksyyliiniliuokseen 10 minuutin ajaksi.
- Huuhtelevä vastavärjättyjä objektilaseja kolme minuuttia deionisoidussa vedessä. Tämä tuottaa punaviolettin tumavärjäyksen.
- Arvioi mikroskooppisesti. Jos peittäminen on tarpeen, käytä vain vesipohjaista petasainetta.

Suorituskykyominaisuudet

Pisteytysmenetelmä

Skannaa siveilyvalmiste (900X) ja valitse ohut alue, jossa erytrosyytit ovat hädin tuskin kosketuksessa. Fosfataasitoimintaa sisältävät alueet näkyvät sinisinä granuloina. Valitse 100 peräkkäistä liuskatumaista ja sauvatumaista neutrofiilistä granulosityyhtiä. Anna luoitukseksi 0–4+ näiden solujen sytoplasmaan saostuneen värin määrän ja voimakkuuden perusteella. Katso pisteytysominaisuudet taulukosta 1. Pisteinä pidetään 100 solun luoitusten summaa.

Taulukko 1. Pisteytysominaisuudet*

Saostunut atsoväri sytoplasmassa				
Solun luokitus	Määrä** (%)	Granulan koko	Värjäyksen voimakkuus	Sytoplasman tausta
0+	Ei yhtään	-	Ei yhtään	Ei yhtään
1+	50	Pieni	Heikko tai kohtalainen	Väritön tai hyvin haalean sininen
2+	50–80	Pieni	Kohtalainen tai voimakas	Väritön tai haalean sininen
3+	80–100	Keskisuuri tai suuri	Voimakas	Väritön tai sininen
4+	100	Keskisuuri tai suuri	Kirkas	Ei näkyvissä

* Taulukossa 1 esitetään mukaelma Kaplow'n havainnoista.^{2,3}

** Atsovärisaostuman peittäminen prosentuaalinen osuus sytoplasman tilavuudesta.

Leukosyyttien alkalisen fosfataasin toiminnan (LAPA) pistemäärä muodostetaan kertomalla laskettujen solujen määrä soluluokitusten arvolla. Näiden lukujen avulla saadaan LAPA-pisteet seuraavissa esimerkeissä esitetyllä tavalla:

Solun luokitus	Laskettu pistemäärä	LAPA-pisteet
0	60	0
1+	20	20
2+	4	28
3+	15	15
4+	1	4
Yhteensä	100	67

Odotetut arvot

Sigma-Aldrich sai tutkimuksissaan seuraavat pisteet 20 normaalille henkilölle. Veri otettiin heparinotuihin putkiin ja siveilyvalmisteet valmistettiin tunnin kuluessa.

Nopea sini-RR	
LAPA-keskiarvo $\pm 1SD$ (keskihajonta)	96 ± 44
LAPA-alue	52–140

Näiltä 20 normaalilta henkilöltä saatiin seuraava pistealue:

Nopea sini-RR
32–182

Jos havaitut tulokset eroavat odotetuista tuloksista, ota yhteyttä Sigma-Aldrichin tekniseen palveluun.

Odotetut havainnot

Ihmisillä alkalisen fosfataasin toiminta rajoittuu kypsiin ja sauvatumaisiin granulositytteihin. Lymfossyyteissä voidaan joskus havaita heikkoa värjäytymistä. Luuytimen osteoblastit ja endoteelisolut värjäytyvät voimakkaasti.

Sarja objektilaseja valmistettiin verestä, joka oli otettu normaaleilta tutkittavilta, viimeisellä raskauskolmanneksella olevilta naisilta, vasta synnyttäneiltä potilailta ja henkilöiltä, joilla oli leukemoidireaktio. Negatiiviset kontrollit valmistettiin lämpöinaktiivoinnilla kuvutulla tavalla. Erilaisia yhdistelmiä nopeaa sini-RR-ää ja vastavärejä (metyleenisiniliuos ja Mayerin hematoksyliiniliuos) suoritettiin replikaatteina ja LAPA-pisteytys laskettiin. Kunkin tutkittavan näytteistä valmistetuista useista objektilaseista saaduilla arvoilla oli läheinen yhtäpitävyys, eikä käytetyllä värjäys-/vastavärjäystekniikalla havaittu vaikutusta niihin. Esimerkiksi raskaana olevalta potilaalta saadulla verellä tehdyistä seitsemästä sivelynäytteestä saatiin pisteet 235–269, joiden keskiarvo oli 255, keskihajonta 11,3 ja variaatiokerroin 4,4 %. Negatiivisilla kontrolleilla ei ilmennyt lainkaan värjättyä materiaalia.

Analytyttiset suorituskyvyminaisuudet

Kaikilla kohderakenteilla suoritetuista testeistä saadut analytyttiset suorituskykytulokset vahvistavat 100-prosenttinen herkkyyden, spesifisyyden ja toistettavuuden.

Luettelonro	Tuotteen kuvaus	Kohde	Määrittymisen sisäisen spesifisyys	Määrittymisen sisäinen herkkyys	Määrittymisen välinen spesifisyys	Määrittymisen välinen herkkyys
FBS25	Nopea sini-RR-suola	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
855	Alkalinen naftoli-AS-MX-fosfaattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3
MHS1	Mayerin hematoksyliiniliuos	Tumat	3/3	3/3	3/3	3/3
854C	Sitraattikonsentraattiliuos	Toiminta-alueet	3/3	3/3	3/3	3/3

Varoitukset ja vaarat

Katso päivitetty riski-, vaara- ja turvallisuustiedot käyttöturvallisuustiedotteesta ja tuotemerkinnöistä.

85L1:



H290 Voi syövyttää metalleja.

H331 Myrkyllistä hengitettynä.

P234 Säilytä alkuperäispakkauksessa.

P261 Vältä sumun tai höyryn hengittämistä.

P271 Käytä ainoastaan ulkona tai tiloissa, joissa on hyvä ilmanvaihto.

P304 + P340 + P311 JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja varmista vaivaton hengitys. Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.

P390 Imeytä valumat vahinkojen estämiseksi.

P403 + P233 Varastoi paikassa, jossa on hyvä ilmanvaihto. Säilytä tiiviisti suljettuna.

85L2:



H290 Voi syövyttää metalleja.

H319 Ärsyttää voimakkaasti silmiä.

H331 Myrkyllistä hengitettynä.

P234 Säilytä alkuperäispakkauksessa.

P261 Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä.

P264 Pese iho huolellisesti käsittelyn jälkeen.

P271 Käytä ainoastaan ulkona tai tiloissa, joissa on hyvä ilmanvaihto.

P304 + P340 + P311 JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja varmista vaivaton hengitys. Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.

P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

Jos tämän laitteen käytön aikana tai sen seurauksena ilmenee vakava vaaratilanne, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

Symbolien selitykset

Symbolit standardin EN ISO 15223-1:2021 mukaisesti

	Valmistaja		Luettelonumero
	Katso käyttöohje		Eräkoodi
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Euroopan unionissa		Vaatumustenmukaisuusvakuutus Euroopan unionin määräysten mukaisesti (IVDR-asetus 2017/746)
	Viimeinen käyttöpäivä		In vitro -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite
	Lämpötilarajoitus		Huomio
	Valmistuspäivä		Maahantuoja
	Valtuutettu edustaja Sveitsissä		

Lähteet

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Yhteystiedot

Voit tehdä tilauksen verkkosivuillamme osoitteessa [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Tekniseen palveluumme voi ottaa yhteyttä teknisen palvelun sivulla osoitteessa [SigmaAldrich.com/techservice](https://sigmaaldrich.com/techservice).

Versiohistoria

Versio 2.0	2014
Versio 3.0	2016
Versio 4.0	2023

Siirretty uuteen pohjaan, jossa on ajantasaiset brändimerkit. Maininta ammattikäytöstä lisätty käyttötarkoitukseen ja varotoimiin. Käyttötarkoitus tarkistettu IVDR-ohjeistusten mukaisesti. "Materiaalin käyttöturvallisuustiedote" päivitetty muotoon "käyttöturvallisuustiedote". Yhteystiedot päivitetty. Poistettu ohje CLSI-ohjeistuksen noudattamisesta näytteenotossa. Symboliosiota poistettu "EN 980" ja tilalle vaihdettu "EN ISO 15223-1:2021". Lisätty haittatapahtumien yhteydessä käytettävät yhteystiedot. Poistettu lähde 4 ja viittaukset numeroitu uudelleen. Lisätty versiohistoriataulukko. Lisätty lisävaaralauseke tuotteille 854C-20ML ja 855-20ML. Lisätty kohta Varoitukset ja vaarat. Lisätty CH-REP-tiedot.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

M-alkukirjain ja Sigma-Aldrich ovat Merck KGaA -yhtiön, Darmstadt, Saksa, tai sen tytäryhtiöiden tavaramerkkejä. Kaikki muut tavaramerkit ovat haltijoidensa omaisuutta. Yksityiskohtaiset tavaramerkkitiedot ovat saatavilla julkisista lähteistä.

Gebruiksaanwijzing

Leukocyten alkalische fosfatase-kit

Procedurenr. 85



Beoogd gebruik

Alkalische-fosfatasekits van Sigma-Aldrich zijn bedoeld als een algemene histologische kleurstof voor laboratoriumgebruik. Alkalische-fosfatasereagentia zijn uitsluitend bedoeld voor professioneel 'in-vitrodiagnostisch gebruik'. Deze handmatige, kwalitatieve histochemische procedure toont de alkalische fosfatase-activiteit aan in leukocyten van humaan bloed of beenmergfijls. Histologische visualisatie van leukocyten geassocieerde alkalische fosfatase is een unieke techniek die momenteel veel gebruikt wordt in de geneeskunde.

In 1929 suggereerde Kay voor het eerst de aanwezigheid van alkalische fosfatase in leukocyten.¹ Pas vele jaren later introduceerde Kaplow echter een praktische kleuringsmethode om het leukocytenenzym aan te tonen.² Kaplow gebruikte natrium α -naphthylfosfaat als substraat, fast blue RR als diazoniumzout en adviseerde een scoringsmethode voor semikwantitatieve vergelijkingen.² Er werden ook verbeteringen voorgesteld die resulteerden in een goed behoud van de celmorfologie. Vervolgens werd α -naphthylfosfaat vervangen door naftol AS-fosfaat. Het is opmerkelijk dat er een goede correlatie is gevonden tussen cytochemische en biochemische technieken voor de bepaling van leukocyten alkalische-fosfaatactiviteit (LAPA).³

Met de Sigma-Aldrich-methode wordt leukocyten alkalische fosfatase bepaald in bloed- of beenmergfijls nadat ze voorzichtig op objectglaasjes zijn gefixeerd. De gefixeerde films worden vervolgens geïncubeerd in een oplossing die naftol AS-MX fosfaat bevat. Als gevolg van fosfataseactiviteit wordt naftol AS-MX vrijgemaakt en onmiddellijk gekoppeld aan een diazoniumzout, waardoor een niet-oplosbaar, zichtbaar pigment wordt gevormd op plaatsen waar fosfataseactiviteit plaatsvindt.

Reagentia

Fast Blue RR Salt (Cat. nr. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, voorgewogen capsules. Het werkelijke gewicht per capsule varieert per zending kleurstof en is geoptimaliseerd door middel van analyse.

Naftol AS-MX fosfaat alkalische oplossing (cat. nr. 855-20ML)

Naftol AS-MX fosfaat, 0,25% (w/w), gebufferd bij pH 8,6, 25 °C. Gevaar. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. BIJ INSLIKKEN: Bel onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts.

Mayer's hematoxyline-oplossing (cat. nr. MHS1-100ML)

Hematoxyline, gecertificeerd, 1 g/L, C.I. 75290, natriumjodaat, 0,2 g/L, aluminiumammoniumhydroxide, 5 g/L en stabilisatoren

Geconcentreerde citraatoplossing (cat. nr. 854C-20ML)

Citroenzuur-natriumcitraat, 1,5 mol/L. Gevaar. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. Draag beschermende handschoenen/oogbescherming/gezichtsbescherming.

Vereiste, maar niet meegeleverde speciale materialen

- Scott's kraanwatervervangingsconcentraat catalogusnr. S5134
- Aceton, ACS-reagens

Opslag en stabiliteit

Bewaar Fast Blue RR-zout onder 0 °C. Bewaar Naftol AS-MX fosfaat alkalische oplossing in de koelkast (2-8 °C). Reagentia zijn stabiel tot de vervaldatum.

Bewaar Mayer's hematoxyline-oplossing goed afgesloten bij kamertemperatuur (18-26 °C), afgeschermd van licht. Plaats de oplossing niet terug na gebruik in een Coplin-potje. Gooi weg als de tijd voor geschikte kleuring de in de procedure aanbevolen tijd met meer dan 5 minuten overschrijdt.

Bewaar geconcentreerde citraatoplossing bij kamertemperatuur (18-26 °C). Bewaar citraat-werkoplossing in de koelkast (2-8 °C). Citraatoplossingen zijn geschikt voor gebruik in afwezigheid van microbiële groei.

Vorbereiding

Fast Blue RR-zout, naftol AS-MX fosfaat alkalische oplossing en Mayer's hematoxyline oplossing worden gebruiksklaar geleverd voor gebruik in de procedure.

Bereid de citraat-werkoplossing door 2 mL citraatconcentraatoplossing met gede-ioniseerd water te verdunnen tot 100 mL.

Om fixeeroplossing (citraatgebufferde aceton, 60%) te bereiden, moet citraat-werkoplossing worden verwarmd tot kamertemperatuur (18-26 °C). Voeg onder voortdurend roeren 2 delen van de citraat-werkoplossing toe aan 3 delen aceton. Gooi weg na gebruik.

Scott's kraanwatervervangende werkoplossing wordt bereid door 1 deel Scott's kraanwatervervangingsconcentraat te verdunnen met 9 delen gede-ioniseerd water.

Voorzorgsmaatregelen

Deze IVD's zijn bedoeld voor in-vitrodiagnostisch gebruik in een klinische laboratoriumomgeving. Deze IVD's zijn uitsluitend bestemd voor professioneel gebruik door gekwalificeerd personeel. IVD's van Sigma-Aldrich mogen bediend worden door laboratoriumpersoneel dat opgeleid is om om te gaan met humane monsters die infectieus kunnen zijn, microscopen en andere laboratoriumapparatuur te gebruiken en met voldoende kleurwaarneming en gezichtsscherpte om kleuren en andere objecten onder een microscoop te onderscheiden.

De normale voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van laboratoriumreagentia moeten worden opgevolgd. Voer afval af met inachtneming van alle plaatselijke, provinciale of nationale voorschriften.

Procedure

Monsterafname

Vers bloed of beenmergfijls of monsters die geanticoaguleerd zijn met heparine mogen gebruikt worden.⁴ EDTA moet VERMEIDEN worden.⁴ Bloedsmeers moeten binnen 8 uur na bereiding gekleurd worden op enzymactiviteit. Als dit echter niet mogelijk is, kan het geleidelijke verlies van alkalische-fosfataseactiviteit worden vertraagd door fixatie en overnachting in de vriezer.⁴ Films moeten ten minste 1 uur vóór fixatie en 3 uur na fixatie worden gedroogd alvorens in te vriezen.

Opmerkingen

Er is een schaarste aan gegevens over verbindingen die de leukocyten alkalische fosfatase-activiteit (LAPA) kunnen verstoren. Van bepaalde geneesmiddelen en andere stoffen is bekend dat ze de circulerende alkalische-fosfataseactiviteit beïnvloeden.⁵ Orale anticonceptiva, cortisol en stress kunnen leiden tot verhoogde scores van leukocyten alkalische fosfatase.⁶

Voer de procedure uit met positieve controles. Deze kunnen verkregen worden van patiënten met pyogene leukocytose, of vrouwen in het derde trimester van de zwangerschap of tijdens de eerste dagen na de bevalling. Leukocyten alkalische-fosfatasescores van deze personen zijn meestal hoger dan 100. Een negatieve controle kan bereid worden van een normaal gefixeerde smear door deze 1 minuut in kokend water te dompelen om het enzym te inactiveren. Controlefilms kunnen tot 1 jaar bewaard worden mits ze gefixeerd bewaard worden, verpakt in Parafilm® bij -70 °C. Deze films moeten ten minste 1 uur vóór fixatie en 3 uur na fixatie aan de lucht worden gedroogd alvorens in te vriezen.

Het wordt sterk aanbevolen dat elk laboratorium zijn eigen verwachte bereik vaststelt, kenmerkend voor de lokale populatie.

De procedure is afhankelijk van de subjectieve beoordeling van de gekleurde cellen. Dit kan resulteren in een grote variatie in de verkregen scores. De temperatuur van het reactiemengsel moet tussen 18-26 °C worden gehouden. Lagere temperaturen resulteren in aanzienlijk lagere scores. Boven 30 °C neemt de activiteit duidelijk toe. Eosinofielen kleuren niet, maar kunnen herkend worden aan dubbellobbige kernen en grote refractiele granula.

Procedure

1. Meet 48 mL gedestilleerd water af in een geschikte bak en stel de temperatuur in op 18-26 °C.
2. Bereid diazoniumzout-oplossing:
Los de inhoud van één capsule Fast Blue RR-zout op in gedestilleerd water (uit stap 1). Een magneetroerder kan nuttig zijn.
3. Voeg 2 mL naftol AS-MX fosfaat alkalische oplossing toe aan de verdunde diazoniumzout-oplossing (uit stap 2). Mengen.
4. Breng de fixeeroplossing op kamertemperatuur (18-26 °C). Fixeer de objectglaasjes door ze 30 seconden onder te dompelen in fixeeroplossing. Spoel voorzichtig 45 seconden in gede-ioniseerd water. Laat de objectglaasjes niet drogen.
5. Voeg de objectglaasjes toe aan het alkalische kleurstofmengsel (uit stap 3) en incubeer 30 minuten bij 18-26 °C. Bescherm ondergedompelde objectglaasjes tegen direct licht. Gooi het alkalische kleurstofmengsel weg na gebruik.
6. Verwijder de objectglaasjes na 30 minuten en spoel ze grondig af met gede-ioniseerd water gedurende 2 minuten. Laat de objectglaasjes niet drogen.
7. Plaats de objectglaasjes gedurende 10 minuten in Mayer's hematoxyline-oplossing.
8. Spoel de glasjes na tegenkleuring met gede-ioniseerd water. Dit resulteert in een roodviolette kernkleuring.
9. Evalueer microscopisch. Als coverslippen nodig is, gebruik dan alleen een waterig inbedmiddel.

Prestatiekenmerken

Scoremethode

Scan de film (900X) en selecteer een dun gebied waar erythrocyten elkaar nauwelijks raken. Locaties met fosfatase-activiteit verschijnen als blauwe granula. Selecteer 100 opeenvolgende gesegmenteerde en bandvormige neutrofiële granulocyten. Geef een score 0 tot 4+ op basis van de hoeveelheid en intensiteit van de neergeslagen kleurstof in het cytoplasma van deze cellen. Raadpleeg Tabel 1 voor de kenmerken van de scores. Het totaal van de scores van 100 cellen wordt beschouwd als de score.

Tabel 1. Kenmerken van scores*

Neergeslagen azokleurstof in cytoplasma				
Celscore	Hoeveelheid** (%)	Grootte granule	Kleuringsintensiteit	Achtergrond van cytoplasma
0+	Geen	-	Geen	Geen
1+	50	Klein	Vaag tot matig	Kleurloos tot zeer lichtblauw
2+	50-80	Klein	Matig tot sterk	Kleurloos tot lichtblauw
3+	80-100	Middelgroot tot groot	Sterk	Kleurloos tot blauw
4+	100	Middelgroot tot groot	Schitterend	Niet zichtbaar

* Tabel 1 vertegenwoordigt een aanpassing van waarnemingen van Kaplow.^{2,3}

** Percentage van het volume cytoplasma ingenomen door neergeslagen azokleurstof.

Om de leukocyten alkalische fosfatase-activiteit (LAPA)-score te verkrijgen, wordt het aantal getelde cellen vermenigvuldigd met de waarde voor celscore. Deze cijfers worden opgeteld om de LAPA-score te verkrijgen, zoals weergegeven in de volgende voorbeelden:

Celscore	Getelde score	LAPA-score
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Totaal	100	67

Verwachte waarden

De volgende scores werden verkregen bij Sigma-Aldrich voor 20 normale personen. Er werd bloed afgenomen in gehepariniseerde buisjes en de films werden binnen een uur gemaakt.

Fast Blue RR	
LAPA-gemiddelde $\pm$ 1SD	96 $\pm$ 44
LAPA-bereik	52-140

Het volgende bereik aan scores werd verkregen bij deze 20 normale personen:

Fast Blue RR
32-182

Als de waargenomen resultaten afwijken van de verwachte resultaten, neem dan contact op met de technische dienst van Sigma-Aldrich voor assistentie.

Verwachte waarnemingen

Bij mensen is de activiteit van alkalische fosfatase beperkt tot rijpe en bandvormige granulocyten. Af en toe kan een zwakke kleuring in lymfocyten worden waargenomen. Beenmergosteoblasten en endotheelcellen kleuren sterk.

Er werd een serie objectglaasjes geprepareerd met bloed van normale personen, vrouwen in het laatste trimester van de zwangerschap, vroege postpartumpatiënten en personen die een leukemoïde reactie vertoonden. Negatieve controles werden bereid door hitte-inactivatie zoals beschreven. Verschillende combinaties van Fast Blue RR en tegenkleuringen (methyleenblauwoplossing en Mayer's hematoxyline-oplossing) werden in duplo uitgevoerd en de LAPA werd gescoord. De waarden die verkregen werden op meerdere objectglaasjes van elke proefpersoon kwamen goed overeen en leken niet beïnvloed te worden door de gebruikte kleurings- of tegenkleuringsmethode. Bijvoorbeeld, 7 smears gemaakt met bloed van een prenatale patiënt leverden scores op variërend van 235-269 met een gemiddelde, standaarddeviatie en variatiecoëfficiënt van respectievelijk 255, 11,3 en 4,4%. Negatieve controles toonden een volledige afwezigheid van gekleurd materiaal.

Analytische prestatiekenmerken

De resultaten van de analytische prestaties voor de gegeven tests, uitgevoerd op alle doelstructuren, bevestigen 100% gevoeligheid, specificiteit en herhaalbaarheid.

Cat. nr.	Productbeschrijving	Doel	Intra-assay specificiteit	Intra-assay gevoeligheid	Inter-assay specificiteit	Inter-assay gevoeligheid
FBS25	Fast Blue RR-zout	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
855	Naftol AS-BI fosfaat alkalische oplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
MHS1	Mayers hematoxyline-oplossing	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
854C	Geconcentreerde citraatoplossing	Locaties van activiteit	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3

Waarschuwingen en gevaren

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad en de etikettering van het product voor bijgewerkte informatie over risico's, gevaren of veiligheid.

85L1:



- H290 Kan bijtend zijn voor metalen.
- H331 Giftig bij inademing.
- P234 Uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren.
- P261 Inademing van nevel of dampen vermijden.
- P271 Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.
- P304 + P340 + P311 NA INADEMING: Breng de persoon in de frisse lucht en zorg dat hij comfortabel kan ademen. Bel een ANTIGIFCENTRUM of een arts.
- P390 Gelekte/gemorste stof opnemen om materiële schade te vermijden.
- P403 + P233 Op een goed geventileerde plaats bewaren. In goed gesloten verpakking bewaren.

85L2:



- H290 Kan bijtend zijn voor metalen.
- H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
- H331 Giftig bij inademing.
- P234 Uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren.
- P261 Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden.
- P264 Na het werken met dit product de huid grondig wassen.
- P271 Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.
- P304 + P340 + P311 NA INADEMING: Breng de persoon in de frisse lucht en zorg dat hij comfortabel kan ademen. Bel een ANTIGIFCENTRUM of een arts.
- P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Blijven spoelen.

Als zich tijdens het gebruik van dit apparaat of als gevolg van het gebruik ervan een ernstig incident heeft voorgedaan, meld dit dan aan de fabrikant en/of zijn gemachtigde vertegenwoordiger en aan uw nationale autoriteit.

Symbooldefinities

Symbolen zoals gedefinieerd in EN ISO 15223-1:2021

	Fabrikant		Catalogusnummer
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing		Batchcode
	Gemachtigd vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap/ Europese Unie		Conformiteitsverklaring van de Europese Unie (gedefinieerd in IVDR 2017/746)
	Uiterste gebruiksdatum		Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Temperatuurlimiet		Let op
	Productiedatum		Importeur
	Geef de bevoegde vertegenwoordiger in Zwitserland aan		

Referenties

- 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
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6): 579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248-250

Contactgegevens

Om een bestelling te plaatsen, bezoek onze website op [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Ga voor technische service naar de technische servicepagina op onze website: [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Herzieningsgeschiedenis

Herz. 2.0	2014
Herz. 3.0	2016
Herz. 4.0	2023

Overgezet naar nieuwe sjabloon met huidige huisstijl. Gespecificeerd voor professioneel gebruik in bedoeld gebruik en voorzorgsmaatregelen. Herzien beoogd gebruik om aan te sluiten bij IVDR-richtlijnen. Veiligheidsinformatieblad bijgewerkt tot veiligheidsinformatieblad. Contactgegevens bijgewerkt. Instructie om CLSI te volgen voor monsterafname verwijderd. EN 980 verwijderd en gewijzigd in EN ISO 15223-1:2021 voor symbolen. Contactinformatie over melding ongewenste voorvallen toegevoegd. Referentie nr. 4 verwijderd en de referenties hernummerd. Een tabel met de herzieningsgeschiedenis toegevoegd. Extra gevarenaanduiding toegevoegd voor 854C-20ML en 855-20ML. Waarschuwingen en gevaren toegevoegd. CH-REP informatie toegevoegd.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

De Initial M en Sigma-Aldrich zijn handelsmerken van Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland of gelieerde ondernemingen. Alle andere handelsmerken zijn eigendom van hun respectieve eigenaars. Gedetailleerde informatie over handelsmerken is beschikbaar via openbaar toegankelijke bronnen.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Navodila za uporabo

Komplet za alkalno fosfatazo levkocitov

Postopek št. 85



Predvidena uporaba

Kompleti za alkalno fosfatazo Sigma-Aldrich so namenjeni splošni laboratorijski uporabi za histološko barvanje. Reagenti alkalne fosfataze so namenjeni samo za profesionalno »diagnostično uporabo in vitro«. Ta ročni, kvalitativni, histokemični postopek dokazuje aktivnost alkalne fosfataze v levkocitih iz človeške krvi ali filmov kostnega mozga. Histološka vizualizacija z levkociti povezane alkalne fosfataze je edinstvena tehnika, ki se trenutno pogosto uporablja v medicini.

Leta 1929 je Kay prvič omenil prisotnost alkalne fosfataze v levkocitih.¹ Vendar je Kaplow šele mnogo let pozneje predstavil praktično metodo barvanja za dokazovanje levkocitnega encima.² Kaplow je kot substrat uporabil natrijev α -naftilfosfat, kot diazonijev sol hitrodelujočo modro sol RR in priporočil metodo ocenjevanja za semikvantitativne primerjave.² Predlagane so bile tudi izboljšave, ki omogočajo dobro ohranitev celične morfologije. Nato je bil α -naftil fosfat nadomeščen z naftol AS fosfatom. Omeniti velja, da je bila ugotovljena dobra korelacija med citokemičnimi in biokemičnimi tehnikami za določanje aktivnosti levkocitnega alkalnega fosfata (LAPA).³

Z metodo Sigma-Aldrich se alkalna fosfataza levkocitov določa v filmih krvi ali kostnega mozga, potem ko jih nežno pritrdimo na stekelca. Fiksirane filme nato inkubiramo v raztopini, ki vsebuje naftol AS-MX fosfat. Zaradi delovanja fosfataze se sprosti naftol AS-MX, ki se takoj poveže z diazonijem soljo in na mestih delovanja fosfataze tvori netopen, viden pigment.

Reagenti

Sol Fast Blue RR (kat. št. FBS25-10CAP)

Fast Blue, C.I. 37155, predhodno stehane kapsule. Dejanska teža na kapsulo se razlikuje glede na serijo barvil in je bila optimizirana z analizo.

Naftol AS-MX fosfatna alkalna raztopina (kat. št. 855-20ML)

Naftol AS-MX fosfat, 0,25 % (m/v), puferiran pri pH 8,6, 25 °C. Nevarno. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Lahko povzroči draženje dihalnih poti. Izogibajte se vdihavanju prahu/dima/plina/meglice/par/razpršila. PRI ZAUŽITJU: Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika.

Mayerjeva raztopina hematoksilina (kat. št. MHS1-100ML)

Hematoksilin, certificiran, 1 g/l, C.I. 75290, natrijev jodat, 0,2 g/l, aluminij-amonijev hidroksid, 5 g/l, in stabilizatorji

Koncentrirana raztopina citrata (kat. št. 854C-20ML)

Citronska kislina – natrijev citrat, 1,5 mol/l. Nevarno. Povzroča draženje kože. Povzroča hude poškodbe oči. Izogibajte se vdihavanju prahu/dima/plina/meglice/par/razpršila. Lahko povzroči draženje dihalnih poti. Nositi zaščitne rokavice/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Posebni materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi

- Scottov koncentrat nadomestka vode iz pipe, kataloška št. S5134
- Aceton, reagent ACS

Shranjevanje in stabilnost

Sol Fast Blue RR hranite pri temperaturi pod 0 °C. Naftol AS-MX fosfatno alkalno raztopino hranite v hladilniku (2–8 °C). Reagenti so stabilni do izteka roka uporabnosti.

Mayerjevo raztopino hematoksilina hranite trdno zaprto pri sobni temperaturi (18–26 °C), zaščiteno pred svetlobo. Po uporabi v kozarcu Coplin raztopine ne vračajte v originalno posodo. Če je čas, potreben za ustrezno obarvanje, daljši od časa, priporočenega v postopku, za več kot 5 minut, ga zavrzite.

Koncentrirano raztopino citrata shranjujte pri sobni temperaturi (18–26 °C). Delovno raztopino citrata hranite v hladilniku (2–8 °C). Raztopine citrata so primerne za uporabo v odsotnosti mikrobnih rasti.

Priprava

Sol Fast Blue RR, naftol AS-MX fosfatna alkalna raztopina in Mayerjeva raztopina hematoksilina so pripravljene za uporabo v postopku.

Pripravite delovno raztopino citrata z razredčenjem 2 ml koncentrirane raztopine citrata na 100 ml z deionizirano vodo.

Za pripravo raztopine za fiksacijo (citratni puferirani aceton, 60 %) segrejte delovno raztopino citrata na sobno temperaturo (18–26 °C). Ob stalnem mešanju dodajte 2 volumna citratne delovne raztopine v 3 volumne acetona. Po uporabi zavrzite.

Delovna raztopina Scottovega nadomestka vode iz pipe se pripravi z razredčenjem 1 volumna koncentrata Scottovega nadomestka vode iz pipe z 9 volumni deionizirane vode.

Previdnostni ukrepi

Ti izdelki IVD so namenjeni za diagnostično uporabo in vitro v kliničnem laboratoriju. Ti izdelki IVD so namenjeni le strokovni uporabi s strani usposobljenega osebeja. Z napravami Sigma-Aldrich IVD lahko upravlja laboratorijsko osebeja, ki je usposobljena za ravnanje s človeškimi vzorci, ki so lahko kužni, za uporabo mikroskopov in druge laboratorijske opreme ter ima sposobnost zaznavanja barv in ostrino vida za razlikovanje barv in drugih predmetov pod mikroskopom.

Upoštevati je treba običajne previdnostne ukrepe pri ravnanju z laboratorijskimi reagenti. Odpadke odstranite v skladu z vsemi lokalnimi, državnimi, pokrajinskimi ali nacionalnimi predpisi.

Postopek

Zbiranje vzorcev

Uporabijo se lahko filmi sveže krvi ali kostnega mozga ali vzorci, antikoagulirani s heparinom.⁴ Izogibajte se EDTA.⁴ Krvne razmaze je treba v 8 urah po pripravi obarvati za encimsko aktivnost. Če to ni mogoče, lahko postopno izgubo aktivnosti alkalne fosfataze odložite s fiksacijo in shranjevanjem čez noč v zamrzovalniku.⁴ Filme je treba posušiti vsaj 1 uro pred fiksacijo in 3 ure po fiksaciji pred zamrzovanjem.

Opombe

Podatkov o spojinah, ki lahko vplivajo na aktivnost levkocitne alkalne fosfataze (LAPA), je malo. Znano je, da nekatera zdravila in druge snovi vplivajo na aktivnost alkalne fosfataze v krvi.⁵ Peroralni kontraceptivi, kortizol in stres lahko povzročijo povišane vrednosti levkocitne alkalne fosfataze.⁶

Izvedite postopek s pozitivnimi kontrolami. Te se lahko pridobi od bolnikov s piogeno levkocitozo ali žensk v tretjem trimesečju nosečnosti ali prvih nekaj dni po porodu. Rezultati levkocitne alkalne fosfataze pri teh osebah običajno presegajo 100. Negativno kontrolo lahko pripravite iz normalnega fiksiranega razmaza tako, da ga za 1 minuto potopite v vrelo vodo, da se encim inaktivira. Kontrolne filme lahko hranite do 1 leta, če jih hranite fiksirane, zavite v Parafilm® pri –70 °C. Te filme je treba posušiti na zraku vsaj 1 uro pred fiksacijo in 3 ure po fiksaciji pred zamrzitvijo.

Priporočljivo je, da vsak laboratorij določi svoje pričakovano območje, značilno za lokalno populacijo.

Postopek je odvisen od subjektivne ocene obarvanih celic. To lahko povzroči velike razlike v pridobljenih ocenah. Temperatura reakcijske mešanice mora biti med 18 in 26 °C. Pri nižjih temperaturah bodo rezultati bistveno nižji. Pri temperaturi nad 30 °C se aktivnost izrazito poveča. Eozinofili se ne obarvajo, prepoznamo pa jih po dvokrakih jedrih in velikih lomljivih granulah.

Postopek

1. V ustrezno posodo odmerite 48 ml destilirane vode in nastavite temperaturo na 18–26 °C.
2. Pripravite raztopino diazonijeve soli: Vsebinsko ene kapsule soli Fast Blue RR raztopite v destilirani vodi (iz koraka 1). V pomoč je lahko magnetni mešalnik.
3. Razredčeni raztopini diazonijeve soli (iz koraka 2) dodajte 2 ml naftol AS-MX fosfatne alkalne raztopine. Mešajte.
4. Raztopino za fiksiranje segrejte na sobno temperaturo (18–26 °C). Stekelca fiksirajte tako, da jih za 30 sekund potopite v fiksirno raztopino. V deionizirani vodi nežno izpirajte 45 sekund. Ne dovolite, da se stekelca posušijo.
5. Stekelca dodajte mešanici alkalnega barvila (iz koraka 3) in jih 30 minut inkubirajte pri temperaturi 18–26 °C. Potopljeni stekelca zaščitite pred neposredno svetlobo. Po uporabi zavrzite mešanico alkalnega barvila.
6. Po 30 minutah odstranite objektna stekelca in jih 2 minuti temeljito spirajte v deionizirani vodi. Ne dovolite, da se stekelca posušijo.
7. Stekelca za 10 minut položite v Mayerjevo raztopino hematoksilina.
8. Kontrastno obarvana stekelca 3 minute spirajte v deionizirani vodi. Pri tem se jedro obarva z rdeče-vijolično barvo.
9. Ocenite mikroskopsko. Če je potrebno prekrivanje, uporabite samo vodni medij za pritrdjevanje.

Značilnosti delovanja

Način točkovanja

Preglejte film (900X) in izberite tanko področje, kjer se eritrociti komajda dotikajo. Mesta fosfatazne aktivnosti bodo videti kot modre granule. Izberite 100 zaporednih segmentiranih in trakastih nevtrofilnih granulocitov. Ocenite od 0 do 4+ na podlagi količine in intenzivnosti oborjenega barvila v citoplazmi teh celic. Značilnosti točkovanja so navedene v tabeli 1. Vsota ocen 100 celic se šteje kot ocena.

Tabela 1. Značilnosti točkovanja*

Ocena celic	Oborjeno azobarvilo v citoplazmi			Ozadje citoplazme
	Količina** (%)	Velikost granul	Intenzivnost obarvanja	
0+	Brez	-	Brez	Brez
1+	50	Malo	Šibko do zmerno	Brezbarvno do zelo blede modro
2+	50–80	Malo	Zmerno do močno	Brezbarvno do blede modro
3+	80–100	Srednje do veliko	Močno	Brezbarvno do modro
4+	100	Srednje do veliko	Briljantno	Ni vidno

* Tabela 1 predstavlja modifikacijo opažanj Kaplowa.^{2,3}

** Odstotek prostornine citoplazme, ki jo zaseda oborina azobarvila.

Da bi dobili oceno aktivnosti alkalne fosfataze levkocitov (LAPA), število prešteti celic pomnožite z vrednostjo za oceno celic. Te vrednosti se seštevajo, da se dobi ocena LAPA, kot je prikazano v naslednjih primerih:

Ocena celic	Preštet rezultat	Rezultat LAPA
0	60	0
1+	20	20
2+	14	28
3+	5	15
4+	1	4
Skupaj	100	67

Pričakovane vrednosti

Pri podjetju Sigma-Aldrich so za 20 normalnih posameznikov pridobili naslednje rezultate. Kri so odvzeli v heparinizirane epruvete in v eni uri pripravili filme.

Fast Blue RR	
Srednja vrednost	96 ± 44
LAPA ± 1SD	
Razpon LAPA	52–140

Pri teh 20 normalnih posameznikih je bil dosežen naslednji razpon rezultatov:

Fast Blue RR	
	32–182

Če opaženi rezultati odstopajo od pričakovanih, se za pomoč obrnite na oddelek za tehnično pomoč podjetja Sigma-Aldrich.

Pričakovana opažanja

Pri ljudeh je aktivnost alkalne fosfataze omejena na zrele in pasovno oblikovane granulocite. Občasno lahko v limfocitih opazimo šibko obarvanje. Osteoblasti kostnega mozga in endotelijske celice se močno obarvajo.

Serija stekelc je bila pripravljena z uporabo krvi, pridobljene od normalnih oseb, žensk v zadnjem trimesečju nosečnosti, bolnic v zgodnjem poporodnem obdobju in oseb z levkemično reakcijo. Negativne kontrole so bile pripravljene s toplotno inaktivacijo, kot je opisano. Različne kombinacije Fast Blue RR in kontrastnih barvil (raztopina metilen modrega in Mayerjeva raztopina hematoksilina) so bile izvedene v več ponovitvah, vrednost LAPA pa je bila ocenjena. Vrednosti, pridobljene na več preparatih, pripravljenih na vsakem subjektu, so se tesno ujemale in ni bilo videti, da bi nanje vplivala uporabljena tehnika barvanja/kontrastnega barvanja. Na primer, pri 7 razmazih, narejenih s krvjo prenatalne pacientke, so bili rezultati v razponu od 235 do 269 s povprečnim, standardnim odklonom in koeficientom variacije 255, 11,3 oziroma 4,4 %. Negativne kontrole so pokazale popolno odsotnost obarvanega materiala.

Značilnosti analitične učinkovitosti

Rezultati analitične učinkovitosti za dane teste, opravljene na vseh ciljnih strukturah, potrjujejo 100-odstotno občutljivost, specifičnost in ponovljivost.

Kat. št.	Opis izdelka	Cilj	Specifičnost znotraj testa	Občutljivost znotraj testa	Specifičnost med testi	Občutljivost med testi
FBS25	Sol Fast Blue RR	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
855	Naftol AS-MX fosfatna alkalna raztopina	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
MHS1	Mayersova raztopina hematoksilina	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
854C	Koncentrirana raztopina citrata	Lokacije aktivnosti	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3

Opozorila in nevarnosti

Vse posodobljene informacije o tveganju, nevarnosti ali varnosti najdete na varnostnem listu in oznaki izdelka.

85L1:



- H290 Lahko je jedko za kovine.
- H331 Strupeno pri vdihavanju.
- P234 Hranite samo v originalni embalaži.
- P261 Ne vdihavati meglice ali hlapov.
- P271 Uporabljati le zunaj ali v dobro prezračevanem prostoru.
- P304 + P340 + P311 PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.
- P390 Odpraviti razlivanje, da se prepreči materialna škoda.
- P403 + P233 Hraniti na dobro prezračevanem mestu. Hraniti v tesno zaprti posodi.

85L2:



- H290 Lahko je jedko za kovine.
- H319 Povzroča hudo draženje oči.
- H331 Strupeno pri vdihavanju.
- P234 Hranite samo v originalni embalaži.
- P261 Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila.
- P264 Po uporabi temeljito umiti kožo.
- P271 Uporabljati le zunaj ali v dobro prezračevanem prostoru.
- P304 + P340 + P311 PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.
- P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

Če je med uporabo te naprave ali kot posledica njene uporabe prišlo do resnega incidenta, o tem obvestite proizvajalca in/ali njegovega pooblaščenega zastopnika ter ustrezen državni organ.

Definicije simbolov

Simboli, kot so opredeljeni v standardu EN ISO 15223-1:2021

	Proizvajalec		Kataloška številka
	Natančno preberite navodila za uporabo		Koda serije
	Pooblaščen zastopnik v Evropski skupnosti/Evropski uniji		Izjava Evropske unije o skladnosti (opredeljena v IVDR 2017/746)
	Rok uporabe		Medicinski diagnostični pripomoček in vitro
	Temperaturna omejitev		Pozor
	Datum izdelave		Uvoznik
	Označuje pooblaščenega zastopnika v Švici		

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
- Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann NY Acad Sci 155:911, 1968
- 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. Annals of Clinical Biochemistry. 1997;34(6):579-581
- Elias JM: Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology, Noyes Publications, New Jersey, 1982, pp 248–250

Kontaktni podatki

Če želite oddati naročilo, obiščite naše spletno mesto [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Če želite tehnično pomoč, obiščite stran tehničnega servisa na našem spletnem mestu [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Zgodovina revizij

Rev. 2.0	2014
Rev. 3.0	2016
Rev. 4.0	2023

Preneseno v novo predlogo s trenutno blagovno znamko. Navedeno za poklicno uporabo v okviru predvidene uporabe in previdnostnih ukrepov. Revidiran je namen uporabe za uskladiitev s smernicami IVDR. Posodobljen je varnostni list materiala v varnostni list. Posodobljeni so kontaktni podatki. Odstranjeno je navodilo, da je treba pri zbiranju vzorcev upoštevati standard CLSI. Odstranjen je standard EN 980 in za simbole spremenjen v standard EN ISO 15223-1:2021. Dodani so kontaktni podatki v primeru neželenih dogodkov. Odstranjena je referenca št. 4 in vnovično oštevilčenje referenc. Dodana je preglednica zgodovine revizij. Dodano je dodatno opozorilo o nevarnosti za 854C-20ML in 855-20ML. Dodana so opozorila in nevarnosti. Dodane so bile informacije o zastopniku v Švici.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

Začetna črka M in Sigma-Aldrich sta blagovni znamki družbe Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija ali njenih pridruženih druž. Vse druge blagovne znamke so last posameznih lastnikov. Podrobne informacije o blagovnih znamkah so na voljo v javno dostopnih virih.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.