

ACID PHOSPHATASE LEUKOCYTE

Colorazione citochimica su strisci di sangue o di midollo per la classificazione delle sindromi linfo-proliferative

10 x 4 test

REF 3093

PREMESSA

Il kit è stato realizzato in modo da diminuire i volumi dei reagenti e il contatto tra il laboratorista ed i reagenti tossici, facilitarne lo smaltimento e semplificare l'esecuzione del test.

Per il kit sono stati impiegati quei reagenti che in base alle attuali conoscenze risultano essere i meno tossici ed inquinanti.

PRINCIPIO DELLA REAZIONE

Gli strisci di sangue o di midollo sono incubati con Naftol AS-BI fosfato e pararosanilina che, in presenza di fosfatasi acida nel citoplasma di linfociti e di monociti, reagiscono formando un precipitato di colore rosso vivo. La determinazione viene anche effettuata in presenza dell'inibitore tartrato. L'intensità e la frequenza dei granuli colorati nei leucociti e l'inibizione da tartrato è valutata al microscopio ottico.

REAGENTI E MATERIALI

Contenuto del kit

* REAGENT 1 Sodio nitrito (liofilo)

TOSSICITÀ: Sostanza tossica per ingestione.

REAGENT 2 Pararosanilina

TOSSICITÀ: Sostanza tossica per contatto e ingestione.

Conservare al riparo dalla luce

REAGENT 3 Tampone

REAGENT 4 Naftol AS-BI fosfato

PIASTRE multi-vaschette (4 vaschette per piastra)

COPERCHIO nero per le piastre

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le Schede di sicurezza.

STABILITÀ: a 2-8°C e ben chiusi si conservano inalterati fino alla data riportata sulla confezione.

REAGENTE SUPPLEMENTARE NON FORNITO

SODIO TARTRATO

Per la classificazione delle 'hairy cells' in cui la fosfatasi acida è inibita da tartrato. La determinazione della fosfatasi acida in assenza ed in presenza di tartrato consente di valutare se nelle cellule è presente un isoenzima inibito da tale composto.

REAGENTI NECESSARI E NON FORNITI

FISSATIVO:

preparazione della soluzione formaldeide 37% 1 volume
di fissaggio dello striscio:

etanolo assoluto 9 volumi

CONTROCOLORAZIONE: soluzione Giemsa.

MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Microscopio ottico 400x o 1000x per la lettura dei vetrini.

Pipette con puntale monouso o pipette Pasteur graduate per il prelievo e la distribuzione dei reagenti.

Termostato a 37°C.

Timer.

Acqua deionizzata.

CAMPIONE

Strisci di sangue (preferibilmente capillare) o di midollo.

I campioni di sangue possono essere raccolti con EDTA od eparina.

Gli strisci di sangue o di midollo possono essere conservati a temperatura ambiente (18-26°C) e protetti dalla polvere, per alcuni giorni senza che si verifichino apprezzabili cambiamenti di attività. I vetrini fissati si conservano per molte settimane.

PROCEDIMENTO

A) FISSAGGIO DEI VETRINI (vedi osservazioni)

1. Fissare gli strisci seccati all'aria mettendoli a contatto per 1 minuto con il fissativo.

2. Lavare entrambi i lati del vetrino con abbondante acqua deionizzata, scolarlo ed attendere che sia asciutto.

Il fissativo contiene formaldeide.

Anche una piccola quantità di formaldeide presente sui vetrini può provocare inibizione dell'enzima.

B) PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima di utilizzarli.

Svitare il tappo a vite di un flacone di Reagent 1 e togliere delicatamente il tappo in gomma al flacone.

1. Prelevare 1 mL di Reagent 2 con una pipetta o con una Pasteur ed aggiungerlo a un flacone di Reagent 1.

Rimettere il tappo in gomma e agitare per inversione fino a completa solubilizzazione del liofilo. Attendere 2 minuti.

2. Riaprire il flacone ed aggiungere 2,5 mL di Reagent 3.

3. Aggiungere 1 mL di Reagent 4, rimettere il tappo ed agitare bene.

STABILITÀ: utilizzare la soluzione di lavoro subito dopo la preparazione.

C) REAZIONE DELLA FOSFATASI ACIDA

1. Disporre su un piano le piastre multi-vaschette necessarie.

Ciascuna piastra e ciascun flacone di soluzione di lavoro consentono di eseguire 4 determinazioni.

2. Appoggiare sulla piastra i vetrini con lo striscio rivolto verso il basso. Lo striscio deve essere rivolto verso il basso e cioè verso il fondo della vaschetta, altrimenti la soluzione di lavoro non andrà a contatto con lo striscio.

3. Spingere il vetrino contro uno dei due bordi lunghi della vaschetta.

Tra l'altro lato maggiore del vetrino e quello della vaschetta si avrà una lunga fessura nella quale si inietterà la soluzione di lavoro.

4. Prelevare 1 mL di soluzione di lavoro con una pipetta o con una Pasteur. Inserire la punta del puntale o della Pasteur nella zona centrale dell'apertura e iniettarvi lentamente la soluzione di lavoro. La soluzione si distribuirà nella vaschetta entrando a contatto con lo striscio. Meno di 1 mL è sufficiente per riempire la vaschetta. Procedere allo stesso modo con gli altri vetrini.

5. Porre la piastra in termostato a 37°C e coprirlo con il coperchio per ripararla dalla luce. Se si utilizzano più piastre, disporre una sull'altra prima di coprirle con il coperchio. Incubare 60 minuti.

6. Prelevare i vetrini con una pinzetta o con le dita (indossando guanti monouso) e sciacquarli con acqua corrente.

Per facilitare il prelievo premere leggermente un'estremità del vetrino in modo che si sollevi l'altra estremità.

7. Le piastre lavate ed asciugate possono essere utilizzate per la conservazione dei vetrini.

D) CONTROCOLORAZIONE (vedi osservazioni)

1. Controcolorare con Giemsa per 10 minuti.

2. Sciacquare con acqua corrente, asciugare e leggere al microscopio ottico. L'esperienza nelle tecniche di citochimica consente la valutazione dei vetrini senza controcolorazione.

RISULTATI E PATOLOGIA

L'attività enzimatica si manifesta con la presenza di granuli color rosso vivo nel citoplasma cellulare.

La reazione è utile nella classificazione delle sindromi linfo-proliferative.

Nella linea linfoide la positività a zolla unica è stata messa in relazione al fenotipo T. L'intensità di reazione nelle plasmacellule del mieloma multiplo è stata messa in relazione con la diagnosi della malattia.

Nella leucemia a cellule capellute la reazione non è inibita dal tartrato.

OSSERVAZIONI

Le piastre possono essere utilizzate anche per il fissaggio e la controcolorazione. In questo caso disporre i vetrini come descritto nel paragrafo C) ed iniettare il fissativo o il colorante invece della soluzione di lavoro. Per i tempi di fissaggio, di controcolorazione e dei relativi lavaggi seguire i procedimenti descritti ai paragrafi A) e D).








SMALTIMENTO RIFIUTI

Smaltire i reagenti e i materiali usati secondo le normative del paese.

BIBLIOGRAFIA

Disponibile su richiesta.

LEGENDA SIMBOLI

	dispositivo medico diagnostico in vitro
	numero di lotto
	numero di catalogo
	limite di temperatura
	usare entro la data
	attenzione
	consultare le istruzioni per l'uso

IVD

CE

Ed. 03 - 12.2023 RR

PRODUTTORE

 FAR

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

tel +39 045 6700870 - sito web <http://www.farddiag.com>

e-mail: order@farddiag.com - e-mail: farddiag@farddiag.com