

ALKALINE PHOSPHATASE LEUKOCYTE

Colorazione citochimica su strisci di sangue o di midollo per la classificazione delle leucemie infocitarie

10 x 4 test

REF 3094

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

Strisci di sangue periferico o di midollo sono incubati a temperatura ambiente con Naftol AS-MX fosfato e Fast Blue BB sale. In presenza dell'enzima fosfatasi alcalina nel citoplasma dei granulociti si forma un precipitato bluastro. L'intensità e la frequenza dei granuli colorati nelle cellule è valutata al microscopio ottico. Il kit viene impiegato per classificare le leucemie infocitarie. Un'elevata concentrazione di fosfatasi alcalina leucocitaria (PAL) è riscontrata nelle granulocitosi reattive, in gravidanza e nella policitemia vera, mentre una bassa concentrazione si riscontra nella leucemia mieloide cronica.

REAGENTI E MATERIALI

Contenuto del kit:

REAGENT 1 Fast Blue BB sale (llofilo)

REAGENT 2 Naftol AS-MX fosfato

PIASTRE multi-vaschette (4 vaschette per piastra)

COPERCHIO nero per le piastre

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

REAGENTI NECESSARI NON FORNITI

FISSATIVO:

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

etanolo assoluto 9 volumi

CONTROCOLORAZIONE: rosso neutro.

MATERIALI NECESSARI 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.

Timer.

Acqua deionizzata.

CAMPIONE

Strisci di sangue (preferibilmente capillare) o di midollo.

Non usare EDTA. Utilizzare solo eparina come anticoagulante.

STABILITÀ: alcuni giorni a temperatura ambiente e protetti dalla polvere.

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

1. Prelevare 4 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 alla completa solubilizzazione del liofilo.

STABILITÀ: la soluzione va utilizzata subito dopo la preparazione.

C) REAZIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA

1. Disporre su un piano le piastre multi-vaschette necessarie. Ogni piastra e ogni 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 della pipetta o della Pasteur nella zona centrale della fessura e iniettare la soluzione di lavoro. Meno di 1 mL è sufficiente per un vetrino. Procedere allo stesso modo con gli altri vetrini.

5. Coprire la vaschetta con il coperchio. Se si utilizzano più vaschette, sovrapporre una all'altra prima di coprirle.

6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (18-26°C).

7. 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.

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

D) CONTROCOLORAZIONE (vedi osservazioni)

1. Controcolorare con rosso neutro per 3 minuti.

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

CALCOLO

L'attività enzimatica si manifesta con una colorazione blu diffusa e con presenza di granuli bluastri. Se si utilizza la colorazione di contrasto i nuclei appaiono evidenti. Per la valutazione quantitativa si contano 100 granulociti attribuendo un punteggio da 0 a +3 in base all'intensità della colorazione sul numero di granuli presenti nel citoplasma.

PUNTEGGIO	
0	nessuna colorazione, assenza di granuli
+1	colorazione diffusa, scarsi granuli
+2	colorazione diffusa più marcata, numerosi granuli
+3	colorazione forte, numerosissimi granuli che stipano il citoplasma conferendogli una colorazione bluastro intensa ed uniforme

RISULTATI E VALORI NORMALI

Per semplicità suggeriamo una classificazione in tre punti:

PUNTEGGIO	x	n. cellule	=	QUANTITA' PAL
0	x	65	=	0
+1	x	20	=	20
+2	x	10	=	20
+3	x	5	=	15
		100		55

L'intervallo del punteggio comunemente accettato come normale va da 20 a 120. È opportuno che ciascun laboratorio determini il proprio valore normale. Si possono eseguire controlli positivi ottenuti da pazienti con leucocitosi piogenica, da donne nel terzo mese di gravidanza o durante i primi giorni postpartum.

PATOLOGIA

Il comportamento della fosfatasi alcalina leucocitaria è soggetto a molteplici variazioni:

Infezioni	Aumentata
Gravidanza	Aumentata
SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE	
Poliglobulie primitive	Normale o aumentata
Mielofibrosi in fase di stato	Aumentata o normale
Leucosi mieloide cronica	Notevolmente ridotta
SINDROMI MIELODISPLASTICHE	
Anemie refrattarie con eccesso di blasti	Ridotta
Leucosi mielomonocitarie croniche	Ridotta
Emoglobinuria parossistica notturna	Notevolmente ridotta
Anemie sideroblastiche primitive idiopatiche	Normale o ridotta
TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	
Trattamenti con ormoni steroidei	Possibile aumento

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