

ADAPTACIÓN A EQUIPOS COBAS c501/c502 DE ROCHE

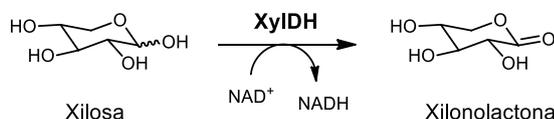


DESCRIPCIÓN:

Xylossay® es un método fiable y automatizable para la cuantificación de la xilosa presente en orina. **Xylossay®** es el método recomendado para la detección de xilosa tras la administración de **LacTEST®** ¹.

PRINCIPIO DEL MÉTODO:

La enzima xilosa deshidrogenasa (XylDH)² cataliza la oxidación específica de xilosa para formar xilonolactona³. Puesto que XylDH es una enzima NAD⁺ dependiente, esta reacción requiere una reducción concomitante del cofactor a NADH:



La formación de NADH puede ser espectrofotométricamente detectada y cuantificada mediante el incremento de la absorbancia a 340 nm en la reacción. De esta forma, los incrementos de absorbancia serán directamente proporcionales a la cantidad de xilosa presente en la muestra.

COMPONENTES DEL KIT:

Cada kit **Xylossay®** de 22 mL permite un total de 155 determinaciones, y contiene un vial de cada uno de los siguientes componentes:

COLOR	COMPONENTES
Marrón	Tampón fosfato 50 mM, pH 8,0 (22 mL)
Naranja	NAD ⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleótido). Liofilizado (66,34 mg)
Morado	Xilosa Deshidrogenasa. Liofilizado (0,6 mg)
Rosa	Calibrador; solución estándar de xilosa (2 mL; 3,75 mg/dL).

1. LacTEST 0,45g Ficha técnica. <http://www.aemps.gob.es>
2. Sánchez-Moreno, I. et al. *J. Biotechnol.* (2016) 234:50-57.
3. Stephens, C. et al. *J. Bacteriol.* (2007) 189: 2181-2185.

EQUIPO ADICIONAL NO SUMINISTRADO:

La preparación de los reactivos requiere el empleo de pipetas o sistemas que permitan dispensar los volúmenes especificados. Los agitadores vórtex pueden ser utilizados cuando se indica. Controles de calidad para evaluar la medida de xilosa.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

IMPORTANTE: la preparación de los reactivos debe realizarse en el siguiente orden:

1. Disolver el contenido del vial **Morado** (Xilosa Deshidrogenasa, liofilizado) en **10 mL** de tampón (Tampón fosfato 50 mM pH 8,0; vial **Marrón**). Mezclar suavemente para evitar pérdida de actividad en la enzima resuspendida. Siempre que sea posible, mantener en frío durante su uso. Esta disolución será el **REACTIVO 2**.
2. Añadir 1 mL de tampón (Tampón fosfato 50 mM pH 8,0; vial **Marrón**) al vial que contiene el NAD⁺ liofilizado (**Naranja**) y agitar vigorosamente hasta su completa disolución (se pueden utilizar agitadores vórtex).
3. Añadir la totalidad del mL de NAD⁺ disuelto (vial **Naranja** + tampón) dentro del vial de tampón (vial **Marrón**). De esta forma el vial marrón contendrá **12 mL** de tampón más NAD⁺ a la concentración apropiada. Mantener en frío siempre que sea posible. Esta disolución será el **REACTIVO 1**.
4. La solución de xilosa (Calibrador; Solución estándar de xilosa, vial **Rosa**) está lista para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD:

Xylossay® debe ser almacenado a 4°C hasta su utilización, siendo estable en estas condiciones durante al menos 18 meses. Una vez preparados los REACTIVOS 1 y 2 tienen una vida útil de al menos 39 días cuando se mantienen a temperaturas de entre 4 y 10°C (estabilidad a bordo de equipos automáticos). Tanto el REACTIVO 1 como el REACTIVO 2 pueden ser congelados a -20°C sin pérdida alguna de su actividad. Ambos reactivos pueden ser congelados-descongelados durante al menos 6 veces sin alterar su funcionamiento.

IMPORTANTE: para utilizar los reactivos congelados, se debe esperar a su completa descongelación (a temperatura ambiente). Una vez descongelados en su totalidad deben agitarse para una completa homogeneización antes de usar.

PROTOCOLO DE ENSAYO:

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: La recogida de muestras de orina debe realizarse siguiendo estrictamente las especificaciones indicadas en la ficha técnica de **LacTEST®** ¹. Se recomienda la centrifugación de las muestras de orina (según protocolo establecido en cada laboratorio) para eliminar cualquier posible precipitado que pueda interferir en el ensayo. Toda muestra que haya sido congelada debe ser agitada para su homogeneización después de la descongelación.

PARÁMETROS: longitud de onda 340 nm, empleando la temperatura definida en el equipo por defecto (generalmente 37°C). La aplicación instrumental para el ensayo se debe diseñar siguiendo las siguientes especificaciones.

CALIBRACIÓN Y PROCEDIMIENTOS DE CONTROL: La calibración de la determinación de xilosa en los equipos analizadores (**CAL**) se debe realizar utilizando la solución estándar de xilosa suministrada con el kit (Calibrador, vial **Rosa**) como referencia de concentración (3,75 mg/dL). Para el control de la calibración y la cuantificación de

xilosa se recomienda usar al menos dos niveles de control acreditados y validados: uno bajo, con concentraciones de xilosa de entre 0,8 y 3 mg/dL, y uno alto, con concentraciones de xilosa de entre 5 y 8 mg/dL. Estos controles no se incluyen en el kit, y se deben adquirir de forma independiente.

PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ENSAYO:

Los volúmenes mostrados pueden ser escalados siempre que se mantenga la proporción final de los mismos.

Reactivo	Blanco	Muestra	CAL
Agua destilada	100 µL	85 µL	85 µL
REACTIVO 1	60 µL	60 µL	60 µL
Muestra	-	15 µL	-
Calibrador	-	-	15 µL
Mezclar la reacción e incubar 5 min. (A1)			
REACTIVO 2	40 µL	40 µL	40 µL
Mezclar la reacción e incubar 5 min. (A2)			

NÚMERO FINAL DE MEDIDAS CON CADA KIT:

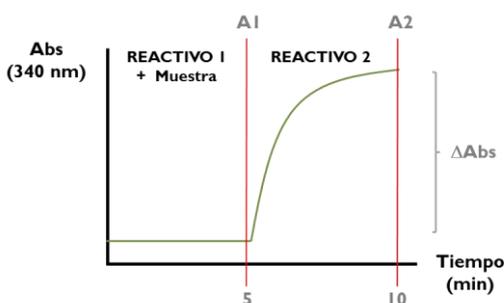
El kit **Xylossay**® de 22 mL permite un total de 155 determinaciones en los equipos Cobas 501/502 de Roche. Debido al volumen muerto que por defecto tienen algunos equipos automáticos, el número de determinaciones puede verse reducido. Las siguientes fórmulas permiten calcular el número final de ensayos en función del volumen muerto:

$$REACTIVO\ 1 = \frac{(12\text{ mL} - \text{Vol. muerto en mL}) \times 1000}{\text{Vol. REACTIVO 1 en ensayo } (\mu\text{L})}$$

$$REACTIVO\ 2 = \frac{(10\text{ mL} - \text{Vol. muerto en mL}) \times 1000}{\text{Vol. REACTIVO 2 en ensayo } (\mu\text{L})}$$

CÁLCULOS:

Valores de Absorbancia (340 nm) por ensayo:



A1 = Absorbancia inicial de la mezcla REACTIVO 1 + Muestra (incubada 5 min).

A2 = Absorbancia final después de añadir REACTIVO 2 (incubado 5 min adicionales, tiempo total de reacción: 10 min).

Las diferencias entre los dos valores de Absorbancia serán proporcionales a la concentración de xilosa, la cual puede ser calculada utilizando la solución estándar de xilosa suministrada con el kit (solución estándar de xilosa, vial rosa):

$$\Delta\text{Absorbancia (340 nm)} = \Delta\text{Abs} = A2 - A1$$

$$\text{Concentración en Muestra} = [Muestra] \text{ (mg/dL)}$$

$$\text{Concentración de xilosa (Calibrador)} = 3,75 \text{ mg/dL}$$

$$[Muestra] = \frac{\Delta\text{Abs (Muestra)}}{\Delta\text{Abs (Calibrador)}} \times 3,75 \text{ mg/dL}$$

La cantidad total de xilosa en la Muestra (mg) se calculará a partir del volumen total de orina recogida durante la prueba.

$$Xilosa \text{ (mg)} = [Muestra] \times \text{Vol Muestra (dL)}$$

EJEMPLO:

Determinación de la cantidad total de xilosa en la muestra de orina de un paciente:

Volumen de Muestra (orina) = **557 mL** = 5,57 dL

- **Ensayo Muestra:** A1 = 0,122

A2 = 0,146

$$\Delta\text{Abs (Muestra)} = 0,146 - 0,122 = 0,024$$

- **Ensayo Calibrador:** A1 = 0,0870

A2 = 0,166

$$\Delta\text{Abs (Calibrador)} = 0,166 - 0,0870 = 0,079$$

$$[Muestra] = \frac{0,024}{0,079} \times 3,75 \text{ mg/dL} = 1,139 \text{ mg/dL}$$

$$Xilosa \text{ (mg)} = 1,139 \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \times 5,57 \text{ dL} = \mathbf{6,34 \text{ mg}}$$

VALORES DE REFERENCIA

Valores normales en adultos:

Prueba	Xilosa en orina (mg)
LacTEST 0,45 g	≥ 19,18

Valores por debajo de 19,18 mg significan hipolactasia.

PARÁMETROS ANALÍTICOS:

Los parámetros analíticos de la aplicación de **Xylossay**® se determinaron en la validación de la técnica en tres equipos automáticos (Cobas c502 de Roche, ILab 600 de Werten y Dimension Vista 1500 de Siemens).

Linealidad: hasta al menos 15 mg/dL en todos los casos.

Límite de detección: entre 0,13 y 0,49 mg/dL.

Reproducibilidad: Los coeficientes de variación entre muestras no deben superar el 15 %.

Exactitud: ≥ 88 %.

Arrastre: ≤ 4 %

FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO:

Los parámetros analíticos establecidos para **Xylossay**® pueden variar ligeramente en función de las características del equipo utilizado. La presencia de algunos azúcares como L-arabinosa o glucosa en altas concentraciones puede afectar a la determinación de xilosa. Por esta razón, la recogida de muestras requiere un ayuno de 10 horas. En estas condiciones no se han encontrado interferencias en la orina recogida.

ANEXO – PARÁMETROS DE LA APLICACIÓN

Los siguientes parámetros han sido optimizados en un equipo Cobas c501 de Roche:

Analizar	Calib.	Rango	Otros
Técnica /Tpo. /Pto.	2 Punt. Fin. ▼	10 ▼	32 70 0 0
Longitud onda (2a/Pri.)	415 ▼	340 ▼	
Vol. Muestra	Configuración Casete		
Norm. 15.0 0.0 0	Cod. 0777773		
Dism. 40.0 15.0 80.0	Días Caducidad 99		
Aum. 25.0 0.0 0	Volumen Reactivo		
Dilución	R1 0 0 Inactivo ▼		
<input checked="" type="radio"/> Agua <input type="radio"/> Diluyen.	R2 60.0 85.0		
	R3 40.0 0		
	<input type="button" value="Config. Botella"/>		
Lim. Linealidad	0 % 0 % 0 0		
Lim. Prozona	0 0 0 0 0 0 Inter. ▼ 0 0		
Límite Abs.	32000 Aument. ▼	No. Versión 00-01	
Detergente	Detergente 1 ▼	Nivel Agitación 2	
Agitac.	M1 M2 M3	<input type="button" value="Guardar"/>	
Alto Agitac. ▼	Bajo Agitac. ▼	Agitac. ▼	Agitac. ▼

Cobas C Pack MULTI (Botella de reactivo vacía)

REACTIVO 1 (Posición B)



REACTIVO 2 (Posición C)

Config. Botella			
Casete Tipo A			
Botella			
a	Anular ▼	0	0.0
b	R2 ▼	155	9.3
c	R3 ▼	155	6.2
<input type="button" value="Anular"/>		<input type="button" value="OK"/>	

Contenedor de reactivos para aplicaciones de canal abierto en equipos Cobas de ROCHE (Cobas c Pack MULTI, referencia Roche: 04593138190). En el caso de XYLOSSAY®, el **Reactivo 1** debe situarse en la **posición B**, y el **Reactivo 2** en la **posición C**. La programación del Pack de reactivo es ligeramente diferente en los equipos COBAS c502 (ventana de programación mostrada en la parte inferior).

Pack React. Tipo B

Pos.	React.	Tests	Vol.
A	R2 ▼ M ▼	155	0.00
B	R2 ▼ S ▼	155	9.30
C	R3 ▼ S ▼	155	6.20

Analizar	Calib.	Rango	Otros
Tipo Calibración <input type="text" value="Lineal"/>		Autocalibración <input checked="" type="radio"/> Intervalo	
Punto	<input type="text" value="2"/>	Casete <input type="text" value="Anular"/>	
Span	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="0"/> <input type="text" value="Día"/>	
Peso	<input type="text" value="0"/>	Cambio Casete <input type="text" value="Anular"/>	
Actualización <input type="text" value="Inter."/> <input type="text" value="0"/> <input type="text" value="0"/>		<input type="radio"/> Transgresión	
Límite SD	<input type="text" value="999"/>	Método	<input type="text" value="Blanco"/>
Límite Duplicado	<input type="text" value="99"/> % <input type="text" value="32000"/> Abs.	Regla	<input type="text" value="1 s"/>
Límite Sensibil.	<input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	Control 1	<input type="text" value="Ning."/>
Límite Abs. S1	<input type="text" value="-32000"/> <input type="text" value="32000"/>	Control 2	<input type="text" value="Ning."/>
<input type="checkbox"/> Auto Enmasc.		Control 3	<input type="text" value="Ning."/>
			<input type="button" value="Guardar"/>

Analizar	Calib.	Rango	Otros
Código Aplicación <input type="text" value="XXX"/>		Valores Referencia	
Ud.	<input type="text" value="mg/dl"/>	Hombre	
Nombre	<input type="text" value="XIL-O"/>	<input type="text" value="99"/> <input type="text" value="Año"/> <input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	
Tipo Result.	<input type="text" value="Activo"/>	<input type="text" value="100"/> <input type="text" value="Año"/> <input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> Repet. Autom.		Mujer	
Límite Alarma	<input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	<input type="text" value="99"/> <input type="text" value="Año"/> <input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	
Límite Repet.	<input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	<input type="text" value="100"/> <input type="text" value="Año"/> <input type="text" value="-99999"/> <input type="text" value="99999"/>	
<input type="checkbox"/> Intervalo de Control <input type="text" value="0"/>		Por defecto	
<input type="checkbox"/> Estabilidad Carga CC Autom. <input type="text" value="1"/>		Sexo <input type="radio"/> Hbre. <input type="radio"/> Mujer	
<input type="checkbox"/> Cualitativo		Rango <input checked="" type="radio"/> Rango 1 <input type="radio"/> Rango 2 <input type="radio"/> Rango 3	
(1) 0	L <input type="text" value="0"/>		
(2) 0	H <input type="text" value="0"/>		
(3) 0	I <input type="text" value="0"/>		
(4) 0			
(5) 0			
(6)			
			<input type="button" value="Guardar"/>

Analizar	Calib.	Rango	Otros
Calibrador			
Código Cal. ^[a]	XXX	XXX	0 0 0 0 0
Concentración	0.0	3.75	
No. Rack – Pos. ^[b]	Sxxxxx-x Sxxxxx-x		
Vol. Muestra	15.0	15.0	10.0 10.0 10.0 10.0 10.0
Vol. Muestra dil.	0.0	0.0	0.0 0.0 0.0 0.0 0.0
Vol. Diluyente	0	0	0 0 0 0 0 0
Guardar			

[a] Configurar en el Menú principal de Calibración, dentro de la pestaña de "Instalar" en la ventana "Añadir Calibrador"

[b] Configurar en el Menú principal de Calibración, dentro de la pestaña de "Calibradores" en la ventana "Asignar Calibrador"