

VERSIÓN PARA EQUIPOS DIMENSION VISTA I 500 DE SIEMENS

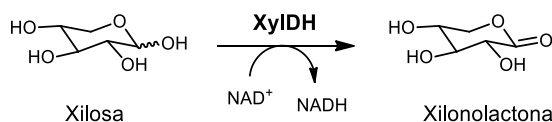


DESCRIPCIÓN:

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 0,45 g**.

PRINCIPIO DEL MÉTODO:

La enzima xilosa deshidrogenasa (XylDH)¹ cataliza la oxidación específica de xilosa para formar xilonolactona². 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:

Xylossay® se suministra en formato de 110 determinaciones de xilosa. Cada kit contiene un vial de cada uno de los siguientes componentes:

VIAL	CONTENIDO Y FORMATO	CANTIDAD
Marrón	Tampón fosfato, 50 mM, pH 8,0 (Solución)	22 mL
Naranja	β-Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD ⁺) (Liofilizado)	66,34 mg ± 12%
Morado	D-Xilosa Deshidrogenasa (Liofilizado)	0,6 mg ± 10%
Rosa	Calibrador: D-(+)-Xilosa (Solución)	2 mL; 3,75 mg/dL ± 5%.

1. Sánchez-Moreno, I. et al. *J. Biotechnol.* (2016) 234:50-57.
2. Stephens, C. et al. *J. Bacteriol.* (2007) 189: 2181-2185.

EQUIPO ADICIONAL NO SUMINISTRADO:

La preparación de los reactivos requiere el empleo de micropipetas o sistemas que permitan dispensar los volúmenes especificados. Los agitadores vórtex pueden ser utilizados cuando se indica. Controles de cuantificación 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 **2,5 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 2 mL de tampón (Tampón fosfato 50 mM pH 8,0; vial marrón) al vial que contiene el NAD⁺ liofilizado (vial naranja) y agitar vigorosamente hasta su completa disolución (se pueden utilizar agitadores vórtex).
3. Añadir la totalidad de los 2 mL de NAD⁺ disuelto (vial naranja + tampón) dentro del vial de tampón (vial marrón). De esta forma el vial marrón contendrá **19,5 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 entre 4° y 8°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 0,45 g**. 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, 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	24 µL	-	-
REACTIVO 1	100 µL	100 µL	100 µL
Muestra	-	24 µL	-
Calibrador	-	-	24 µL
Mezclar la reacción e incubar 5 min. (A1)			
REACTIVO 2	14 µL	14 µL	14 µL
Mezclar la reacción e incubar 5 min. (A2)			

NÚMERO FINAL DE MEDIDAS CON CADA KIT:

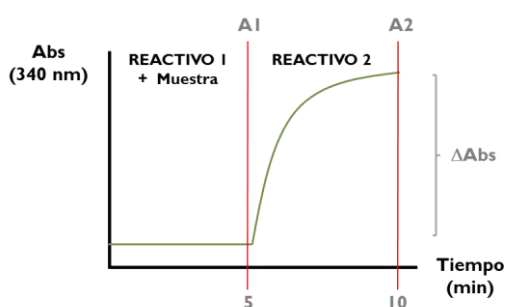
Debido al volumen muerto que por defecto tienen algunos equipos automáticos, el número de determinaciones puede verse reducido. Las siguientes fórmulas permiten calcular el número final de ensayos en función del volumen muerto:

$$REACTIVO 1 = \frac{(19,5 \text{ mL} - \text{Vol. muerto en mL}) \times 1000}{\text{Vol. REACTIVO 1 en ensayo } (\mu\text{L})}$$

$$REACTIVO 2 = \frac{(2,5 \text{ mL} - \text{Vol. muerto en mL}) \times 1000}{\text{Vol. REACTIVO 2 en ensayo } (\mu\text{L})}$$

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):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 Werfen 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.



Immunostep S.L

Avda. Universidad de Coimbra, s/n

Cancer Research Center (CIC)

Campus Miguel de Unamuno

37007 Salamanca (Spain)

Tel. (+34) 923 294 827

www.immunostep.com

ANEXO – PARÁMETROS DE LA APLICACIÓN

Los siguientes parámetros han sido optimizados en un equipo Dimension Vista 1500 de Siemens :

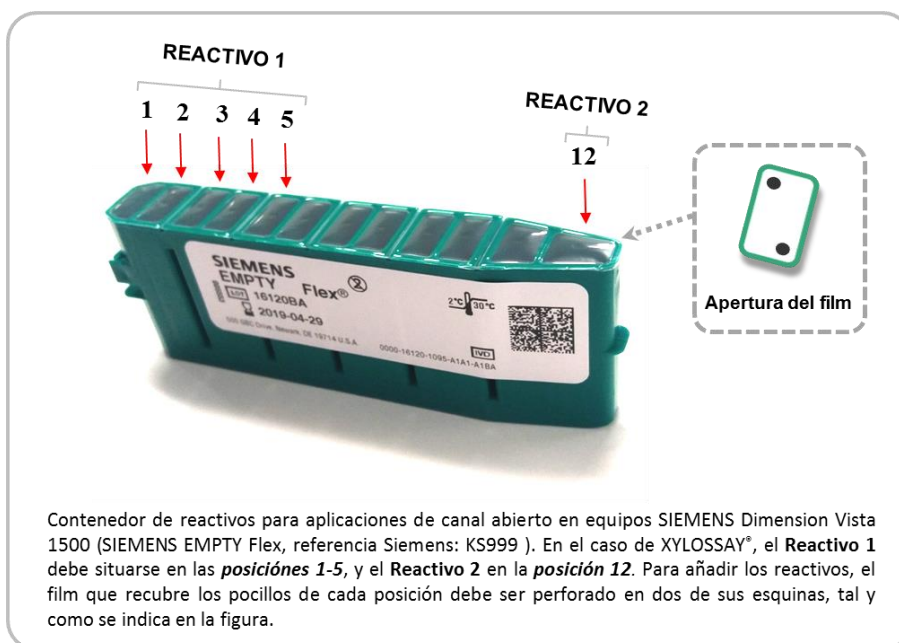
Menú **Avanzado** > **Configuración** > **Métodos definidos por el usuario** > **Crear nuevo**

Nombre método ID Unidad Modo

Proceso | Reactivo | Cálculo | Calibración | Muestra

Dispens.	Tiempo	Componente 1	Mezcla	Componente 2	Mezcla	Diluyente	Volumen total	Mezcla
D1	-21	R1 100 μL	Ninguna	--- 0 μL	Ninguna	0 μL	100 μL	Ninguna
S1	0	s 24.0 μL				0 μL	24 μL	Moderada
D2	392	R2 14 μL	Ninguna	--- 0 μL	Ninguna	0 μL	14 μL	Moderada
D3	39	--- 0 μL	Ninguna	--- 0 μL	Ninguna	0 μL	0 μL	Ninguna
S2	662	s 0.0 μL				0 μL	0 μL	Ninguna

Volumen total: 138 μL



Contenedor de reactivos para aplicaciones de canal abierto en equipos SIEMENS Dimension Vista 1500 (SIEMENS EMPTY Flex, referencia Siemens: KS999). En el caso de XYLOSSAY®, el **Reactivo 1** debe situarse en las **posiciones 1-5**, y el **Reactivo 2** en la **posición 12**. Para añadir los reactivos, el film que recubre los pocillos de cada posición debe ser perforado en dos de sus esquinas, tal y como se indica en la figura.

	Reactivo	Pruebas	Vida (horas)	Volumen	
1	R1	27	2160	2992	Vida en el instrumento (horas) 2160
2	R1	27	2160	2992	
3	R1	27	2160	2992	
4	R1	27	2160	2992	
5	R1	27	2160	2992	
6	Vacío	0	0	0	
7	Vacío	0	0	0	
8	Vacío	0	0	0	
9	Vacío	0	0	0	
10	Vacío	0	0	0	
11	Vacío	0	0	0	
12	R2	131	2160	2186	

Formato
 Absorbancia

Principal
 340

Secundaria

Tiempo
 P1 310
 P2 620
 P3 -21
 P4 -21

Dilución
 1.00

DOI --- **DOF** --- **DOF** ---

Nombre	Fórmula
mau1	R93[340]
mau2	(r179[340])
CalculationNumber	mau2-mau1

Errores

Chequeo --- **Lectura 1** -21 - **Lectura 2** -21 **Iniciador** --- 0

Absorbancia **Añadir**

Curva cal. **LINEAL** Intervalo (días) **30**

Niveles del calibrador

2

Nivel	Peso	Repeticiones
1	1.00	3
2	1.00	3

Diluciones del calibrador

Crear	Componente	Diluyente	Factor de dilución	Aspiración mínima
<input type="checkbox"/>	L1			200
<input type="checkbox"/>	L2			200

Orina

	Bajo	Alto
Rango de ensayo	0.2	15
Rango de referencia	0	15
Caducidad (minutos)	120	

Predilución

Volumen muestra **0**

Factor de dilución **0**

Diluyente **SDIL**

Autodilución

Superior Inferior

Volumen muestra **15** **70**

Factor dilución **5** **2**

Diluyente **SDIL**

Menú **Avanzado** > **Calibración** > **Calibradores** > **Nuevo**

<p>Nombre producto: XILOcal</p> <p>Canal abierto: Sí</p> <p>Nº lote: XXXXX</p> <p>Fecha caducidad: XXXX-XX-XX</p> <p>Estab. en el instr.: 720</p> <p>Estab. vial abierto: 720</p> <p>Perforaciones máx.: 720</p> <p>Tipo de fluido: Orina</p> <p>Obsoleto: No</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="3">Valores botella</th> <th colspan="3">Valores punto calibración</th> </tr> <tr> <th></th> <th>A</th> <th>B</th> <th>Unidad</th> <th>Nivel</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>Unidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Volumen</td> <td>2000</td> <td>2000</td> <td>µL</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>XILO</td> <td>0</td> <td>3,75</td> <td>mg/dL</td> <td>XILO</td> <td>0</td> <td>3,75</td> <td>mg/dL</td> </tr> </tbody> </table>	Valores botella			Valores punto calibración				A	B	Unidad	Nivel	1	2	Unidad	Volumen	2000	2000	µL					XILO	0	3,75	mg/dL	XILO	0	3,75	mg/dL	
Valores botella			Valores punto calibración																													
	A	B	Unidad	Nivel	1	2	Unidad																									
Volumen	2000	2000	µL																													
XILO	0	3,75	mg/dL	XILO	0	3,75	mg/dL																									
<input type="checkbox"/> Calibrador preparado externamente																																