

3029-0010

Neonatal Total Galactose kit

Instrucciones de uso. Reactivos para 960 ensayos

Fabricante:
Wallac Oy,
Mustionkatu 6, FI-20750 Turku, Finlandia
www.revvity.com

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

CE

revvity

SÍMBOLOS

	<i>In vitro</i> diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / <i>In-vitro</i> -Diagnostikum / Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> / Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> / Medicinteknisk produkt avsedd för <i>in vitro</i> -diagnostik / Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik / <i>In vitro</i> diagnosztikai orvostechikai eszköz / Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Batch code / Code du lot / Chargenbezeichnung / Código de lote / Codice di lotto / Satsnummer / Batchkode / Gyártási tételszám / Número do lote
	Packing number / Numéro d'emballage / Packnummer / Número de envase / Numero confezioni / Förpackningsnummer / Emballagenummer / Csomagszám / Número de embalagem
	Catalog number / Référence du catalogue / Bestellnummer / Número de catálogo / Riferimento di catalogo / Listnummer / Bestillingsnummer / Katalógusszám / Código
	Use by / Utiliser jusqu'au / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Utilizzare entro / Använd före / Udløbsdato / Lejárat napja / Data limite de utilização
	Temperature limitation / Limites de température / Temperaturbegrenzung / Limitación de temperatura / Limiti di temperatura / Temperaturbegränsning / Temperaturbegrænsning / Megengedett hőmérséklet / Limite de temperatura
	Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen / Contenido suficiente para <n> ensayos / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Räcker till "n" antal tester / Indeholder tilstrækkeligt til "n" test / A doboz tartalma <n> vizsgálat / Conteúdo suficiente para <n> testes
	Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten / Consúltense las instrucciones de uso / Consultare le istruzioni per l'uso / Läs bruksanvisningen / Se bruksanvisningen / Olvassa el a használati utasítást! / Consultar Instruções de uso
	Manufacturer / Fabricant / Hersteller / Fabricante / Fabbricante / Tillverkare / Producent / Gyártó / Fabricante
	Environmental hazard / Dangereux pour l'environnement / Umweltgefährlich / Peligroso para el medio ambiente / Pericoloso per l'ambiente / Miljöfarlig / Miljøfarlig / Környezetre veszélyes / Perigoso para o meio ambiente



Causes severe skin burns and eye damage / Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves / Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden / Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves / Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari / Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon / Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader / Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz / Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves



This way up / Haut / Diese Seite oben / Este lado arriba / Questo lato in alto / Denna sida upp / Denne side op / Álló helyzet / Este lado para cima



Recyclable / Recyclable / Recyclebar / Reciclable / Riciclabile / Återvinningsbart / Genanvendeligt / Újrahasznosítható / Reciclável

Neonatal Total Galactose kit

FINALIDAD DEL KIT

Este kit sirve para la determinación cuantitativa de las concentraciones de galactosa total (galactosa y galactosa-1-fosfato) en muestras de sangre seca en papel de filtro, como ayuda para la detección de galactosemia en recién nacidos.

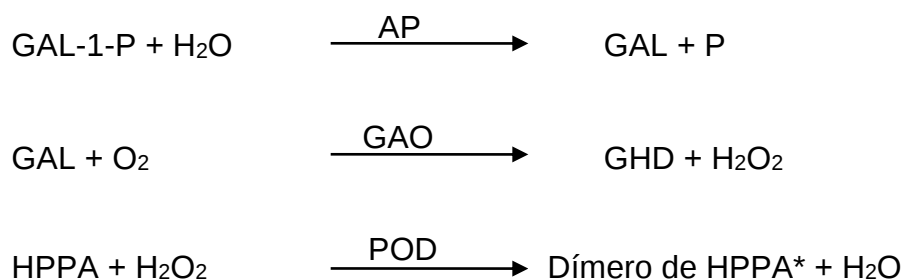
RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

α -D-galactosa se metaboliza a través de una serie de reacciones secuenciales denominadas "ruta de Leloir". Las tres enzimas que catalizan estas reacciones son galactoquinasa (GALK, EC 2.7.1.6), galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT, EC 2.7.7.12) y UDP-galactosa 4-epimerasa (GALE, EC 5.1.3.2). La deficiencia de cualquiera de estas enzimas en seres humanos da lugar a un tipo de trastorno metabólico heredado: la galactosemia. La forma más frecuente y clínicamente grave de galactosemia es la galactosemia clásica, que se produce por la deficiencia de GALT. (1) La determinación de la concentración de galactosa y galactosa-1-fosfato en muestras de sangre seca se realiza para explorar la deficiencia de cualquiera de las tres enzimas que participan en el metabolismo de la galactosa.

La galactosemia clásica afecta aproximadamente a 1/30.000 – 1/60.000 nacidos vivos (1). Si no se diagnostica y se trata en el recién nacido, puede producir diarrea, deshidratación, ictericia, insuficiencia hepática, hipoglucemia, cataratas, retraso en el desarrollo y la muerte al cabo de unas cuantas semanas (2). La sepsis por *Escherichia coli* parece ser especialmente frecuente en los neonatos galactosémicos y es habitualmente la causa de la muerte (3). La enfermedad se trata eliminando de la dieta todos los alimentos que contengan lactosa y galactosa (4).

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El kit Neonatal Total Galactose utiliza un método fluorescente de galactosa oxidasa. El ensayo mide la galactosa total, es decir, tanto la galactosa como la galactosa-1-fosfato. El esquema siguiente resume las reacciones que tienen lugar durante el procedimiento del ensayo:



GAL-1-P = Galactosa-1-fosfato
 AP = Fosfatasa alcalina
 GAL = Galactosa
 P = Fosfato
 GAO = Galactosa oxidasa
 GHD = D-galacto-hexadialdosa
 POD = Peroxidasa
 HPPA = Ácido 3-(*p*-hidroxifenil) propiónico
 * = Fluorescente

La fluorescencia se puede medir utilizando una longitud de onda de excitación central de 340 nm y una longitud de onda de emisión central de 405 nm.

CONTENIDO DEL KIT

Cada kit Neonatal Total Galactose contiene reactivos para 960 ensayos.

La fecha de caducidad del kit sin abrir viene indicada en una etiqueta exterior. Almacenar el kit a +2–+8°C. Tenga en cuenta que las tarjetas de calibrador y de control deben conservarse a -30 – -16°C antes de abrir el envase.

Reactivos

Componente			Cantidad	Almacenamiento y caducidad
Galactose calibrators (Calibradores de galactosa) (valores aprox.)			1 tarjeta de papel de filtro (Whatman nº 903) con 5 juegos de manchas de sangre seca	Almacenar congelado en la bolsa original con el desecante y protegido de la humedad y la luz. Estable a -30 – -16°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez abierto, conservar a +2–+8°C durante 4 semanas como máximo. Asegúrese de que la envoltura de plástico permanezca sellada durante el almacenamiento.
A	0 µmol/L sangre	(0 mg/dL)	Las concentraciones exactas de galactosa se indican en el certificado de control de calidad específico del lote, incluido en el kit.	
B	80 µmol/L sangre	(1.5 mg/dL)		
C	220 µmol/L sangre	(4.0 mg/dL)		
D	500 µmol/L sangre	(9.0 mg/dL)		
E	1000 µmol/L sangre	(18 mg/dL)		
F	2220 µmol/L sangre	(40 mg/dL)		
Galactose controls (Controles de galactosa) (valores aprox.)			1 tarjeta de papel de filtro (Whatman nº 903) con 5 juegos de manchas de sangre seca	Almacenar congelado en la bolsa original con el desecante y protegido de la humedad y la luz. Estable a -30 – -16°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez abierto, conservar a +2–+8°C durante 4 semanas como máximo. Asegúrese de que la envoltura de plástico permanezca sellada durante el almacenamiento.
Normal			Los valores diana de los controles se indican en el certificado de control de calidad específico del lote, incluido en el kit.	
190 µmol/L de sangre	(3.5 mg/dL)			
Patológico				
530 µmol/L de sangre	(9.5 mg/dL)			

Factor de conversión: 1 mg/dL = 55.5 µmol/L.

Los calibradores y controles se preparan en sangre lavada humana, con ProClin 300¹ como conservante. Los calibradores contienen galactosa y los controles contienen tanto galactosa como galactosa-1-fosfato. La concentración de hemoglobina es de aproximadamente 170 g/L antes de dispensarla en papel Whatman, n° 903. El nivel de hematocrito es del 50 al 55%, que es aproximadamente igual al de un recién nacido.

Los calibradores se han calibrado según un método de HPLC-MS/MS basado en el método descrito por Du y Anumula (5).

Zinc Sulfate Reagent (Reactivo de sulfato de zinc)	1 frasco, 30 mL	+2—+8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco.
---	-----------------	---

El reactivo listo para usar contiene < 25% de sulfato de zinc.

NOTA: El reactivo de sulfato de zinc causa lesiones oculares graves y es tóxico para los organismos acuáticos y puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. No lo vacíe en desagües.

Galactose Reconstitution Buffer (Tampón de reconstitución galactosa)	1 frasco, 240 mL	+2—+8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco.
---	------------------	---

La solución tampón lista para usar contiene tris(hidroximetil)aminometano y ProClin 300.

Galactose Substrate Reagent (Reactivo de sustrato de galactosa)	10 frascos, seco	+2—+8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. Proteger del calor y de la luz.
--	------------------	---

El reactivo contiene ácido 3-(*p*-hidroxifenil)propiónico (HPPA).

Galactose Oxidase Reagent (Reactivo de galactosa oxidasa)	10 frascos, liofilizado	+2—+8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. Proteger del calor y de la luz.
--	-------------------------	---

El reactivo contiene < 0.05% de sulfato cúprico, sacarosa, fosfato de sodio, galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides*, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina de intestino de bovino, y superóxido dismutasa de eritrocitos de bovino.

¹ ProClin es una marca registrada de Rohm and Haas, Co.

Stop Solution (Solución de parada)	1 frasco, 240 mL	+2—+8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco.
---------------------------------------	------------------	---

La mezcla lista para usar contiene glicina y hidróxido sódico.

NOTA: La solución de parada contiene hidróxido sódico (< 2.5%) y provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Maneje con extremo cuidado. Lleve prendas protectoras adecuadas, guantes y protección ocular y facial. En caso de contacto con los ojos o la piel, aclare inmediatamente con abundante agua y acuda a un médico. En caso de contacto con los ojos, aclare inmediatamente con abundante agua y acuda a un médico.

White microplates (Microplacas blancas) (sin recubrimiento, 96 pocillos)	10 placas	+2—+25°C
--	-----------	----------

Truncated V-bottomed, clear microplates (Microplacas claras con fondo en V truncado) (sin recubrimiento, 96 pocillos)	10 placas	+2—+25°C
---	-----------	----------

Barcode labels for the plate (Etiquetas de código de barras para la placa)	30 unidades	Nota: los códigos de barras son específicos del lote.
---	-------------	---

Lot-specific quality control certificate (Certificado de control de calidad específico del lote)	1 unidad	
---	----------	--

MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO CON EL KIT

El kit Neonatal Total Galactose requiere los siguientes componentes:

1. Fluorímetro, con capacidad para medir la fluorescencia desde la parte superior del pocillo y utilizando la longitud de onda central de excitación de 340 nm y la longitud de onda central de emisión de 405 nm (por ej. 1420 VICTOR™ 2D) con impresora y ordenador

2. Taladro, con capacidad para perforar discos de papel de filtro con un diámetro de 3.2 mm (1/8 pulgadas) [por ej. el Wallac DBS Puncher (nº de ref. 1296-071), Panthera-Puncher™ 9 (nº de ref. 2081-0010) o un taladro manual (nº de ref. 10457593)]
3. Agitador automático, con capacidad para agitar a 600–950 rpm [por ej. el DELFIA® Plateshake (nº de ref. 1296-003/004) o equivalente]

Además, se necesita lo siguiente:

- cubetas de dilución con tapa que ajuste perfectamente
- pipetas o cilindros graduados para medir volúmenes de reactivos en mL
- pipetas de precisión multicanal para la dispensación de volúmenes de 5–50 µL y 30–300 µL o sistema de pipeteado automático
- puntas de pipeta
- recipientes de reactivo
- etanol absoluto
- agua desionizada
- tarjetas de muestras que utilicen un papel de filtro aprobado por la FDA

TOMA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre deben tomarse mediante una punción en el talón y colocarse directamente en el papel de filtro.

Concentraciones de hemoglobina ≤ 250 g/L no interfieren con la prueba. Una concentración de glutatión elevada anómala (≥ 60 mg/dL) puede causar una importante reducción desde el punto de vista clínico de la concentración aparente de galactosa. Las muestras lipémicas también interfieren en la prueba, lo que provoca un aumento de la concentración aparente de galactosa. A concentraciones de lípidos elevadas, el riesgo de resultados aparentemente falsos positivos es menor.

Las muestras de sangre de niños que no hayan tomado suficiente leche materna o maternizada con galactosa pueden producir valores bajos.

Los programas de cribado neonatal difieren entre sí en el tipo de muestra requerida. En Estados Unidos, la recomendación es una mancha de sangre, de aproximadamente 12.7 mm (1/2 de pulgada) de diámetro, obtenida mediante una punción en el talón y recogida en papel de filtro. La punción de sangre neonatal en el talón se obtiene habitualmente de 2 a 6 días después del nacimiento, pero puede que en algunos programas de cribado los tiempos y el número de muestras sean distintos. Consulte las normativas de carácter local para conocer los tiempos y las tomas de muestras de cribado adecuados. El dispositivo de toma de muestras debe cumplir las normativas nacionales. Los métodos basados en muestras de sangre seca requieren de una obtención, manipulación y transporte adecuados. El documento LA4-A5 (6) del CLSI describe la técnica de toma de muestra, cuyos principales puntos se exponen a continuación:

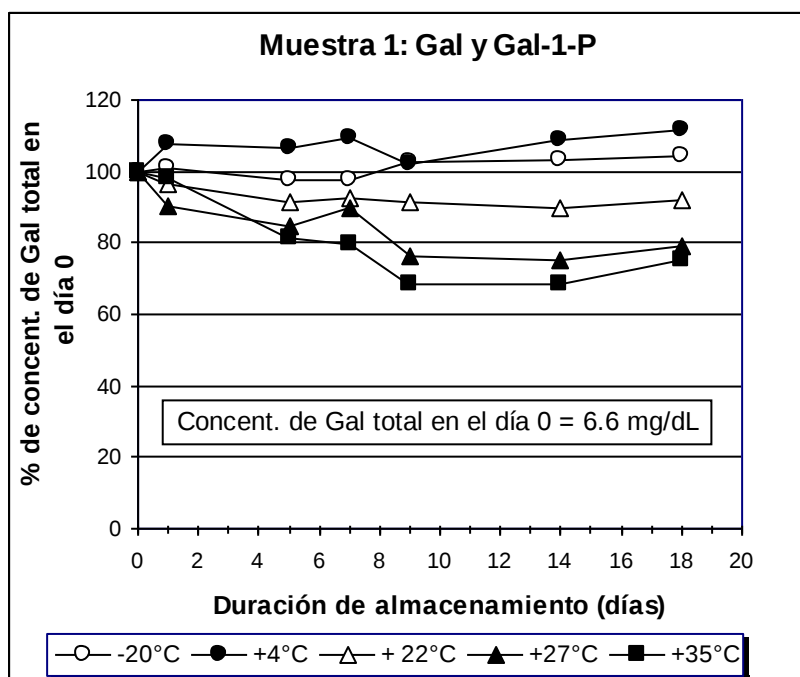
- Limpiar la piel con una gasa mojada en alcohol y dejar secar al aire.
- Realice una punción en el talón del recién nacido con una lanceta estéril o con un dispositivo de incisión en el talón hasta una profundidad de 1.0–2.0 mm. En los niños pequeños una punción realizada a mayor profundidad puede causar daños óseos.
- Limpiar la primera gota de sangre. Colocar suavemente el papel de filtro sobre una gota grande de sangre y, en un solo paso, dejar que se absorba una cantidad de sangre suficiente como para llenar completamente el círculo preimpreso en el papel de filtro. Examinar ambos lados del papel de filtro para comprobar que la sangre ha penetrado y ha impregnado el papel. Si se aprieta excesivamente el sitio de punción, podría causar hemólisis de la muestra o la mezcla de líquidos tisulares con la muestra. No colocar varias gotas sucesivas en el círculo (esto ocasiona la formación de capas).
- Dejar secar la muestra de sangre al aire en posición horizontal durante al menos 3 horas a temperatura ambiente (+18–+25°C), sin exponer a la luz directa. No caliente ni apile las muestras durante el proceso de secado.
- Comprobar que se ha rellenado la información necesaria en la tarjeta de toma de la muestra. La información preimpresa mínima necesaria sobre el dispositivo de toma de muestras incluye:
 - apellido (y nombre si está disponible), sexo, fecha de nacimiento (opcional: hora de nacimiento), peso al nacer y edad; (indicar si tiene menos de 24 h), y número de identificación del paciente
 - nombre y apellido de la madre
 - fecha de toma de la muestra (opcional: hora de toma de la muestra)
 - nombre y dirección del remitente (opcional: centro en el que ha nacido)
 - nombre y número de teléfono del médico (profesional de atención sanitaria)
 - nombre y dirección del programa de cribado de neonatos
 - cada tarjeta debe tener un número de serie único y una fecha de caducidad
- Antes de colocar las muestras en un contenedor para transporte, las manchas de sangre seca de las tarjetas de toma de muestras deben separarse mediante una barrera física o girarse 180° con respecto a las tarjetas que están inmediatamente encima o debajo. También se pueden proteger las muestras de sangre colocando un papel o cartón doblado que las cubra o bien papel cristal entre las mismas.
- Para el embalaje y transporte de la muestra siga las normativas locales de correo y transporte. Las muestras no deben colocarse en recipientes sellados herméticamente (por ejemplo, bolsas de plástico o aluminio). Si es necesario, deben incluirse bolsas desecantes en número suficiente. La humedad y el vapor son perjudiciales para la muestra de sangre seca.
- Envíe por correo u otro medio de transporte la muestra al laboratorio antes de que transcurran 24 horas desde que se tomó, a no ser que el laboratorio de cribado lo determine de otra forma.

Algunos laboratorios de cribado pueden solicitar información adicional en la tarjeta, por ejemplo si el bebé fue anterior o posterior al término y, en este caso, en qué grado, si fue un parto gemelar, información acerca de la alimentación y posibles antibióticos, y si se realizó alguna transfusión de sangre. Consulte las normativas de carácter local y las políticas institucionales para conocer las desviaciones con respecto a la información mínima necesaria sobre el dispositivo de toma de muestras.

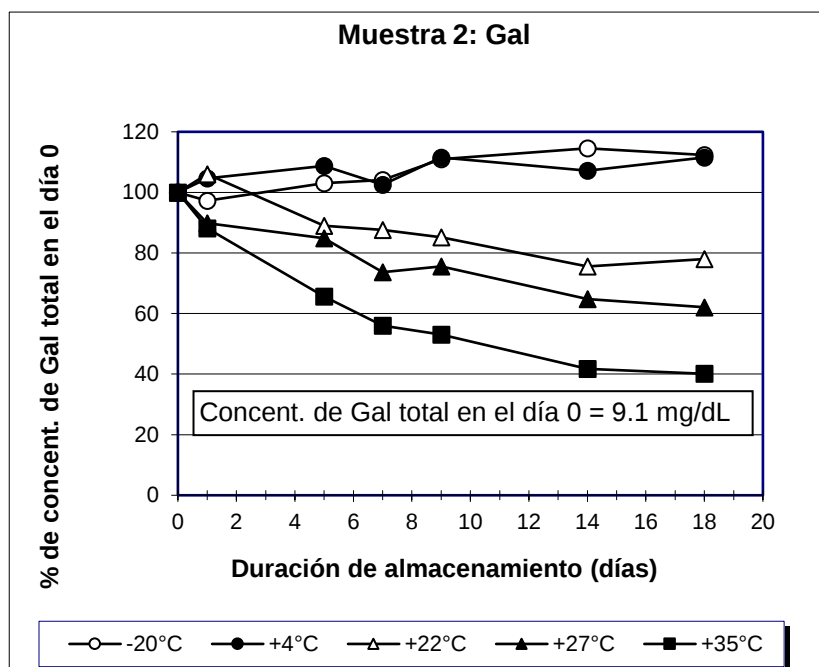
NOTA: Se debe prestar especial atención a las condiciones de almacenamiento y transporte (véanse las siguientes ilustraciones) de las muestras del DBS. Almacenar las muestras en ambientes con temperatura y humedad elevadas aumenta el riesgo de obtener falsos negativos para el cribado.

La influencia de la duración, de la humedad y de la temperatura de almacenamiento en la concentración de galactosa se ha estudiado² mediante distintas pruebas artificiales. A continuación se muestran los resultados de dos muestras que representan el área más relevante desde el punto de vista clínico.

En la muestra 1, se han añadido a sangre adulta galactosa (Gal) y galactosa-1-fosfato (Gal-1-P) y se ha colocado sobre papel de filtro. En la muestra 2, sólo se ha añadido galactosa a sangre adulta. La concentración de Gal-1-P se indica en pesos de equivalente de galactosa (1 mmol/L de Gal-1-P = 1 mmol/L Gal = 18.0 mg/dL de galactosa total).



² Estudio realizado en Wallac Oy, Turku, Finlandia.



CUIDADOS Y PRECAUCIONES

Para diagnóstico *in vitro*.

Este kit debe ser utilizado únicamente por personal cualificado.

Sólo el personal técnico cualificado podrá realizar las tareas de reparación de todo el equipo necesario para este kit.

Este kit contiene reactivos, calibradores y controles fabricados a partir de componentes de sangre humana. La sangre humana se ha sometido a métodos de ensayo aprobados por la FDA o equivalentes, y se han obtenido resultados negativos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos anti-hepatitis C y anticuerpos anti-VIH 1 y 2. No obstante, deben seguirse todas las precauciones recomendadas para la manipulación de derivados sanguíneos. Consultar la publicación "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" del U.S. Department of Health and Human Services o las normas locales o nacionales.

Tratar todas las muestras de pacientes como potencialmente infecciosas.

Peligro: El reactivo de sulfato de zinc provoca lesiones oculares graves y es tóxico para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos. No verter en sumideros, vías fluviales ni en la tierra.

Atención: La solución de parada contiene hidróxido sódico (< 2.5%) y provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Lleve prendas protectoras adecuadas, guantes y protección ocular y facial. En caso de contacto con los ojos, aclare inmediatamente con abundante agua y acuda a un médico. En caso de contacto con los ojos, aclare inmediatamente con abundante agua y acuda a un médico.

Todos los reactivos pueden ser irritantes.

Siga la normativa local para la manipulación de soluciones etanólicas.

Todos los residuos se deben eliminar siguiendo la normativa en vigor.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Realizar cada determinación por duplicado para los calibradores y los controles. En cada placa debe realizarse una curva de calibración. Las muestras pueden procesarse en simple. Antes de usarlos, se debe dejar que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (+19–+25°C).

1. Preparación de los reactivos

Estabilidad una vez reconstituídos

Solución de extracción

7 días entre +19 y +25°C.
Manténgalo bien cerrado cuando no se utilice.

Prepare la solución de extracción mezclando tres partes de reactivo de sulfato de zinc con dos partes de etanol, por ejemplo, añada 24 mL de reactivo de sulfato de zinc a 16 mL de etanol. Se necesitan 2.5 mL de esta mezcla para cada placa.

Mezcla de tampón/agua

7 días entre +2 y +8°C.

Mezcla una parte de agua desionizada con una parte de tampón de reconstitución galactosa. Se necesitan 10 mL de esta mezcla para cada placa.

Reactivo de galactosa oxidasa incluido
el reactivo de sustrato de galactosa

60 minutos entre +19 y +25°C.

NOTA: Utilice el tampón de reconstitución galactosa no diluido para la reconstitución del reactivo.

Reconstituya el reactivo de galactosa oxidasa añadiendo 6 mL de tampón de reconstitución galactosa a un vial de reactivo de galactosa oxidasa liofilizado y mezcle suavemente.

Reconstituya el reactivo de sustrato de galactosa añadiendo 1 mL de tampón de reconstitución galactosa a un vial de reactivo de sustrato de galactosa seco. Vuelva a tapar el vial e inviértalo hacia arriba y hacia abajo varias veces para disolver el reactivo de sustrato de galactosa completamente. Transfiera todo el reactivo de sustrato de galactosa al vial de reactivo de galactosa oxidasa, por ejemplo, con una pipeta. Lave el vial de reactivo de sustrato de galactosa añadiendo 2 mL de tampón de reconstitución galactosa y transfiera la solución al vial de reactivo de galactosa oxidasa.

El volumen final de reactivo de galactosa oxidasa reconstituido es de 9 mL.

NOTA: El reactivo de galactosa oxidasa debe utilizarse en un intervalo de 5–60 minutos después de la reconstitución.

2. Taladre en duplicados unos discos de papel de filtro que contienen manchas de sangre secas de los calibradores (A-F) y de los controles (N y Abn) en los pocillos de una microplaca clara con fondo en V truncado utilizando un taladro automático o manual. Taladre los discos en el medio de la mancha de sangre para minimizar la variación. El diámetro de los discos debe ser de aproximadamente 3.2 mm (1/8 de pulgada). Sólo se añade un disco por pocillo. El siguiente mapa de placas se muestra como ejemplo. Cada laboratorio puede decidir acerca de la mejor colocación de los controles y de las muestras.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Tira	
Cal A	Cal A	Cal B	Cal B	Cal C	Cal C	Cal D	Cal D	Cal E	Cal E	Cal F	Cal F	A	
Ctrl I	Ctrl II	1º Des	2º Des	3º Des	etc.							B	
											Ctrl I	Ctrl II	H

NOTA: Las pipetas multicanal se pueden utilizar en cada paso.

3. Añada 15 µL de solución de extracción a cada pocillo que contenga un disco de papel de filtro. Agite la placa durante un minuto usando el agitador con agitación **lenta** (600–950 rpm) para garantizar que todos los discos se han humedecido con la solución de extracción.
4. Incube a temperatura ambiente durante 60 (60–70) minutos sin agitar. No cubra ni apile las placas.
5. Añada 80 µL de la mezcla de tampón/agua a cada pocillo que contenga un disco. Agite la placa durante un minuto usando el agitador con agitación **lenta** (600–950 rpm) para mezclar los contenidos de los pocillos. **NOTA: la transferencia debe comenzar durante los 15 minutos siguientes al mezclado (véase el paso siguiente).**
6. Transfiera 60 µL del contenido de cada pocillo al pocillo correspondiente de una microplaca blanca. **NOTA: Cambie las puntas de pipeta entre transferencia y transferencia para evitar la contaminación de las muestras.**
7. Añada 75 µL de reactivo de galactosa oxidasa reconstituido a cada pocillo de la microplaca blanca. Evite el contacto de la pipeta con el contenido de la placa. Agite la placa durante un minuto usando el agitador con agitación **lenta** (600–950 rpm) para

mezclar los contenidos de los pocillos. **NOTA: El reactivo de galactosa oxidasa debe utilizarse en un intervalo de 5–60 minutos después de la reconstitución.**

8. Incube a temperatura ambiente durante 60 (60–90) minutos sin agitar. No cubra ni apile las placas.
9. Vierta aproximadamente 11 mL de solución de parada por placa en un recipiente de reactivo. Esto debería de medirse para prevenir que se desperdicie. Añada 100 µL de solución de parada a cada pocillo. Agite la placa durante un minuto usando el agitador con agitación **lenta** (600–950 rpm) para mezclar los contenidos de los pocillos.
10. Mida la fluorescencia utilizando una longitud de onda central de excitación de 340 nm y la longitud de onda central de emisión de 405 nm. La placa debe leerse en el transcurso de una hora después de añadir la solución de parada. Consulte el manual de su instrumento para ver información detallada.

NOTA: Si no se utiliza un fluorímetro 1420 VICTOR 2D, puede ser necesario ajustar la energía de excitación del fluorímetro para conseguir la curva de calibración presentada en la sección "CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL ENSAYO".

Si utiliza el fluorímetro 1420 VICTOR 2D con el protocolo de galactosa total (GAO) predefinido, asegúrese de que cuenta con el software de la versión 1.12, revisión 2 o superior. Para obtener más información, póngase en contacto con su representante local de servicio técnico.

Las propiedades del marcador de fluorimetría de 1420 VICTOR 2D del kit Neonatal Total Galactose (3029) son las siguientes:

Energía de la lámpara de OC:	=	***
Filtro de la lámpara de OC:	=	F340 – Ranura A8
Filtro de emisión:	=	F405 – Ranura A8
Apertura de emisión:	=	Normal
Posición de contador:	=	Superior
Tiempo de conteo:	=	1

*** El valor de energía de la lámpara es específico del instrumento.

Si utiliza MultiCalc® ³, compruebe el protocolo de galactosa total neonatal. Si cambia el número de repeticiones para muestras desconocidas, cambie también el protocolo convenientemente (para editar los parámetros, ver el manual del fluorímetro o el manual del MultiCalc).

³ MultiCalc es una marca registrada de Revvity, Inc.

```

    ASSAY TYPE IS IFMA
01  DUAL ASSAY                = NO
03  MEASURING PARAMETERS      = Eu
20  X-AXIS (CONCENTRATION)    = LIN
21  Y-AXIS (RESPONSE)         = MEAS
22  FITTING ALGORITHM         = REGR UNWEIGHT LINEAR
25  STANDARD CURVE            = NEW
26  STANDARDS ON 2.. PLATES   = NEW

CODING
  2 STD                        = A  (Comprobar si las concentraciones
  2 STD                        = B  de los calibradores de galactosa
  2 STD                        = C  corresponden a las indicadas en el
  2 STD                        = D  certificado de control de calidad
  2 STD                        = E  específico del lote. Si no fuera así,
  2 STD                        = F  introducir las concentraciones
  1 UNKN                      nuevas.)
END

```

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. Para el buen uso del kit neonatal es esencial leer y entender bien todas estas instrucciones. Los reactivos suministrados con este kit están pensados para utilizarlos como una sola unidad. No mezclar reactivos de dos kits con distinto número de lote, aunque sean idénticos. No usar los reactivos de un kit después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del mismo.
2. Cualquier desviación del procedimiento de ensayo puede afectar a los resultados.
3. Fuentes exógenas tales como fibras o polvo pueden causar fluorescencia.
4. Los valores de fluorescencia pueden variar con el tiempo. No obstante, al utilizar calibradores en cada placa, las concentraciones calculadas permanecen constantes.
5. Antes de usarlos, se debe dejar que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (+19–+25°C).
6. Utilice el pipeteado inverso en todos los pasos con excepción de la transferencia (paso 6). El pipeteado inverso es, en general, más preciso cuando se dispensan volúmenes pequeños. No obstante, en el caso de la transferencia, la mancha de sangre sigue en el pocillo y puede ocasionar que entren burbujas de aire en el interior de la pipeta.
7. Compruebe que todos los pocillos tengan un disco tras el proceso de taladro.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Los resultados se calculan mediante regresión lineal basada en el método de mínimos cuadrados. Para más información, vea el Apéndice 1.

Si utiliza 1420 VICTOR 2D con MultiCalc, el software incorpora programas para la reducción de datos y los resultados se obtienen en forma de impresiones de curvas de calibración, concentraciones desconocidas, etc. (vea información más detallada en el manual del fluorímetro o en el manual del MultiCalc).

Las concentraciones de galactosa-1-fosfato se indican en peso de equivalentes de galactosa (1 mmol/L de galactosa-1-fosfato = 1 mmol/L galactosa = 18.0 mg/dL de galactosa total).

Calibración

En cada placa debe realizarse una curva de calibración completa.

Control de calidad

Se recomienda el uso de muestras de control para cerciorarse de la validez de los resultados día a día. Los controles deben procesarse de la misma manera que las muestras. El kit incluye controles a dos niveles distintos. Estos controles deben procesarse en cada placa. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo y valor medio aceptables. La media establecida debe estar en ± 2 desviaciones estándar de los valores indicados en el certificado de control de calidad. Se recomienda que los laboratorios establezcan sus propios controles a diferentes niveles, además de los controles incluidos en el kit. Sólo se deben notificar los resultados de las muestras si los resultados de los controles del ensayo cumplen los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio (7). Asegúrese de que se cumplan los requisitos locales y nacionales aplicables.

Asimismo, se recomienda la participación en programas de control de calidad externos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Al igual que con cualquier otra prueba de análisis *in vitro*, los datos obtenidos con el kit Neonatal Total Galactose deben utilizarse únicamente como una ayuda a otros procedimientos médicos establecidos, y sus resultados deben interpretarse en conjunción con otros datos clínicos de los que disponga el facultativo. Deberá utilizarse un procedimiento de laboratorio para confirmar los niveles elevados de galactosa y galactosa-1-fosfato.

Se reconocen los siguientes factores como causantes de resultados anormales en el ensayo analítico:

- muestras de manchas que no estén impregnadas de sangre uniformemente
- muestras de manchas taladradas demasiado cerca del borde de la mancha de sangre
- muestras obtenidas o secadas incorrectamente

- manchas de sangre que no se eluyen debido al deterioro de la muestra, causado por la exposición al calor y a la humedad
- contaminación del papel de filtro de la mancha de sangre con materia fecal

Una concentración de glutatión elevada anómala (≥ 60 mg/dL) puede causar una importante reducción desde el punto de vista clínico de la concentración aparente de galactosa. Las muestras lipémicas también interfieren en la prueba, lo que provoca un aumento de la concentración aparente de galactosa. A concentraciones de lípidos elevadas, el riesgo de resultados aparentemente falsos positivos es menor.

Las muestras de sangre de niños que no hayan tomado suficiente leche materna o maternizada con galactosa pueden producir valores bajos.

No se puede descartar la fluorescencia endógena como fuente de fluorescencia. Los pocillos sin muestra de sangre pueden producir valores de galactosa en el rango normal o superiores a éste.

Ver también la sección "NOTAS DE PROCEDIMIENTO".

VALORES ESPERADOS⁴ E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se determinaron los valores esperados utilizando el fluorímetro 1420 VICTOR 2D.

La determinación de resultados aparentemente positivos de galactosemia se basa en el uso de un valor de corte, tal y como se explica a continuación. Al utilizar percentiles de población para calcular los valores de corte, se reduce el impacto del sesgo debido a diferencias de calibración entre los métodos. Los resultados del ensayo pueden variar en función de la edad del niño en el momento de la extracción de sangre, así como por otras causas. Tenga en cuenta que los valores mencionados en esta sección sólo son orientativos, ya que cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia y valores de corte.

NOTA: No se debe utilizar un valor de corte que se base en datos obtenidos utilizando otro producto de galactosa total.

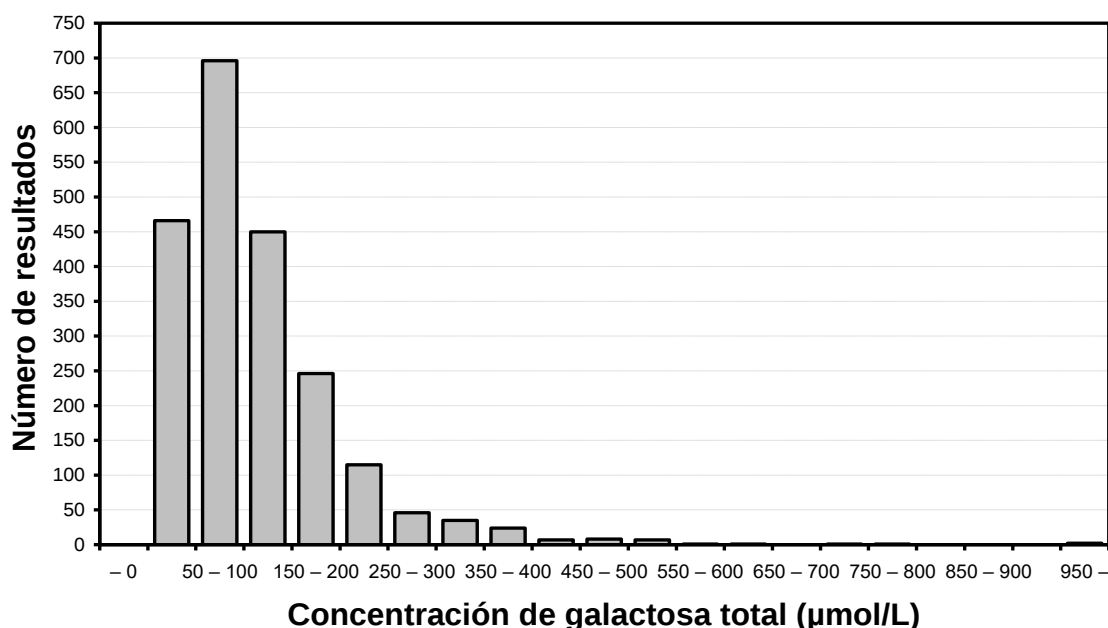
Resultados aparentemente positivos

La determinación de resultados aparentemente positivos de galactosemia se basa en la utilización de un valor de corte que permite distinguir entre resultados aparentemente positivos y aparentemente negativos. Se utiliza una zona de ambigüedad para reflejar la imprecisión del ensayo.

Los resultados aparentemente positivos para galactosemia deberían confirmarse utilizando un procedimiento de confirmación, por ejemplo galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT) (8). Siga las indicaciones locales para el análisis de seguimiento.

⁴ Estudio realizado en Wallac Oy, Turku, Finlandia.

El kit Neonatal Total Galactose se utilizó para analizar 2109 muestras de cribado rutinarias de recién nacidos en EE. UU. A continuación se muestra la distribución de los resultados:



A continuación se muestran las estadísticas descriptivas:

	µmol/L	mg/dL
Mediana	94	1.7
Percentil 95	283	5.1
Percentil 97.5	355	6.4
Percentil 99	461	8.3
Percentil 99.5	549	9.9

Además, se analizaron 7 muestras con niveles elevados conocidos de galactosa total. Estas muestras se han confirmado resultados aparentemente positivos de galactosemia con Neonatal Total Galactose kit.

Zona de ambigüedad

Para reducir el número de falsos negativos y falsos positivos se debe identificar una zona de ambigüedad. Este intervalo refleja el valor de corte más o menos la imprecisión (variación dentro del lote) multiplicada por dos del ensayo de galactosa total neonatal relativo al valor de corte. Este método corresponde a aproximadamente el 95% de los resultados relativos al valor de corte.

Las muestras cuyos valores de galactosa total estén incluidos en la zona de ambigüedad del cribado inicial no deben tenerse en consideración, ni como negativas ni como aparentemente positivas, para la galactosemia. Estas muestras deben volver a analizarse por éste y por otro método (como el método de la galactosa 1-fosfato uridiltransferasa) lo antes posible.

Si el ensayo de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa da un resultado de aparentemente positivo, la muestra debe considerarse un aparentemente positivo para la galactosemia. Si el resultado del ensayo de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa es normal y se ha demostrado que la integridad de la muestra es aceptable, el recién nacido debe considerarse como aparentemente negativo para la galactosemia clásica.

Resultados aparentemente negativos

Las muestras que en el cribado inicial tengan una concentración de galactosa total inferior al límite inferior de la zona de ambigüedad deben considerarse como aparentemente negativos para la galactosemia.

Notificación de resultados

Se recomienda notificar las muestras cuyos resultados sean inferiores a 72 $\mu\text{mol/L}$ (1.3 mg/dL) como "< 72 $\mu\text{mol/L}$ " o "< 1.3 mg/dL".

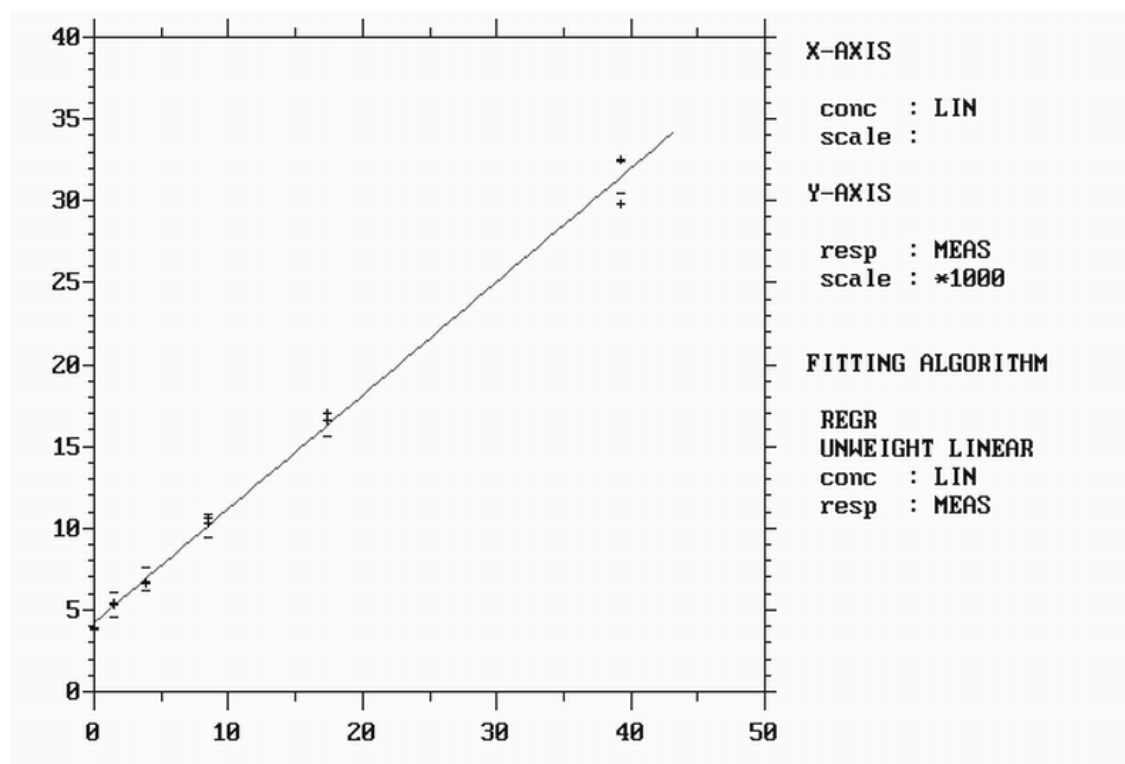
Las concentraciones de la muestra por encima del calibrador más alto no deben considerarse exactas, pero estas muestras sí deben considerarse aparentemente positivas.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL ENSAYO

El rendimiento analítico se determina con el fluorímetro 1420 VICTOR 2D.

El intervalo de medición del ensayo comprende desde el límite de detección hasta el calibrador más alto.

A continuación se presenta una curva de calibración típica ($n = 2$) obtenida con el kit Neonatal Total Galactose:



Precisión⁵: La precisión se determinó según el documento EP5-A2 del NCCLS (9).

En el estudio 1 se analizaron tres niveles de muestras de sangre seca enriquecidas con 4 replicados en 18 ensayos durante 6 días. Los análisis los realizaron tres operarios utilizando tres lotes del kit y dos instrumentos. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

En el estudio 2 se analizaron tres niveles de muestras de sangre seca enriquecidas con 4 replicados en 20 ensayos durante 20 días. Los análisis los realizó un operario utilizando un lote del kit y un instrumento. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Estudio 1

Muestra	n*	Concentración media de galactosa		Variación dentro de una placa (CV%)	Variación total dentro del lote (CV%)	Variación entre los lotes (CV%)	Variación total (CV%)
		μmol/L	mg/dL				
1	143	394	7.1	6.6	12.1	2.1	12.3
2	144	766	13.8	6.5	10.6	2.4	10.8
3	144	1121	20.2	5.3	8.6	0.4	8.6

*n = número total de mediciones de cada muestra.

⁵ Estudio realizado en Wallac Oy, Turku, Finlandia.

Estudio 2

Muestra	n*	Concentración media de galactosa		Variación dentro de una placa (CV%)	Variación total dentro del lote (CV%)
		μmol/L	mg/dL		
1	80	194	3.5	7.8	12.7
2	80	610	11	7.2	11.8
3	80	1280	23	6.0	8.4
4	80	2000	36	5.2	8.6

*n = número total de mediciones de cada muestra.

Límite inferior de detección⁶: El límite de blanco y el límite de detección se determinaron según el documento EP17-A del NCCLS (10). El límite de blanco y el límite de detección del kit Neonatal Total Galactose fueron de 39 μmol/L (0.7 mg/dL) y 72 μmol/L (1.3 mg/dL), respectivamente. El límite de blanco se define como el percentil 95 de la distribución de los valores del blanco (n = 100). El límite de detección se define como la concentración media de las muestras de nivel bajo (n = 250) con distribución gaussiana, en donde menos del 5% está por debajo del límite de blanco.

Linealidad⁷: La linealidad se determinó según el documento EP6-A del NCCLS (11). Se demostró la linealidad del método desde el límite de detección, 72 μmol/L (1.3 mg/dL), hasta 3108 μmol/L (56 mg/dL), con una diferencia relativa máxima de -17% a una concentración de 67 μmol/L (1.2 mg/dL). La diferencia relativa fue de ± 5% en el resto de puntos de dilución.

Comparación de los métodos⁸: La comparación de los métodos se determinó según el Documento EP9-A2 del NCCLS (12).

Se comparó el kit Revvity Neonatal Total Galactose (y) con un kit de otro fabricante (x) utilizando muestras de sangre seca en papel de cribado rutinarias de recién nacidos en el intervalo de 72 μmol/L a 1970 μmol/L (1.3–35.5 mg/dL) determinado con el kit de Revvity. La correlación fue:

$$y = 0.65x + 1.73, \quad r = 0.87 \quad (n = 842)$$

Se determinaron los valores de corte de galactosa total por percentil tanto para el kit Neonatal Total Galactose de Revvity como para el kit del otro fabricante analizando 2109 muestras de sangre seca en papel de cribado rutinarias de recién nacidos que representaban a una población estadounidense. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

⁶ Estudio realizado en Wallac Oy, Turku, Finlandia.

⁷ ver arriba

⁸ Estudio realizado para Wallac Oy, Turku, Finlandia.

Valores de corte de galactosa total por percentil				
	Kit de Revvity		Kit disponible comercialmente	
	$\mu\text{mol/L}$	mg/dL	$\mu\text{mol/L}$	mg/dL
Mediana	94	1.7	33	0.6
Percentil 95	283	5.1	233	4.2
Percentil 97.5	355	6.4	316	5.7
Percentil 99	461	8.3	521	9.4
Percentil 99.5	549	9.9	678	12.2

En las tablas a continuación se presentan los resúmenes de cribado para los que se utilizaron los percentiles 95 y 99. Las muestras utilizadas en el estudio, representativas de una población estadounidense, incluían 2116 muestras de sangre seca de recién nacidos (2109 muestras de sangre seca de cribado rutinarias y siete muestras retrospectivas, tres de las cuales resultaron ser verdaderos positivos para galactosemia).

En las tablas a continuación, los positivos del cribado (+) son muestras $\geq$ al valor de corte y los negativos del cribado (-) son muestras $<$ valor de corte.

Resumen de cribado utilizando el percentil 95				
Kit disponible comercialmente	Kit de Revvity	Total	Diagnóstico de galactosemia	Sin diagnóstico de galactosemia
+	+	73	3	70
+	-	41	0	41
-	+	46	0	46
-	-	1956	0	1956
Total		2116	3	2113

Resumen de cribado utilizando el percentil 95		Kit disponible comercialmente		
		+	-	Total
Kit de Revvity	+	73	46	119
	-	41	1956	1997
	Total	114	2002	2116

Cuando se utilizó el percentil 95 como valor de corte para ambos métodos, el porcentaje de concordancia para los positivos fue del 64% (73/114) y el porcentaje de concordancia general fue del 95.9% ((73+1956)/2116).

Resumen de cribado utilizando el percentil 99				
Kit disponible comercialmente	Kit de Revvity	Total	Diagnóstico de galactosemia	Sin diagnóstico de galactosemia
+	+	21	3	18
+	-	8	0	8
-	+	9	0	9
-	-	2078	0	2078
Total		2116	3	2113

Resumen de cribado utilizando el percentil 99		Kit disponible comercialmente		
		+	-	Total
Kit de Revvity	+	21	9	30
	-	8	2078	2086
	Total	29	2087	2116

Cuando se utilizó el percentil 99 como valor de corte para ambos métodos, el porcentaje de concordancia para los positivos fue del 72.4% (21/29) y el porcentaje de concordancia general fue del 99.2% ((21+2078)/2116).

Las concentraciones de galactosa total de las tres muestras de galactosemia verdadera utilizadas en el estudio fueron las que se muestran en la tabla a continuación:

Concentraciones de galactosa total de las muestras positivas verdaderas		
Nº de muestra	Kit de Revvity (mg/dL)	Kit disponible comercialmente (mg/dL)
1	16.6	23.9
2	12.1	14.6
3	22.2	39.1

Tenga en cuenta que los valores dados en esta sección sólo son orientativos, ya que cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia y valores de corte.

Recuperación⁹: Las muestras de sangre sobrecargadas se han utilizado para establecer la recuperación de galactosa en diferentes concentraciones. Estas muestras se han ensayado por triplicado en 2 ensayos (n = 6). Las muestras se sobrecargaron con galactosa, galactosa-1-fosfato o ambas (cantidades molares equivalentes). La cantidad de galactosa total añadida fue de 610 µmol/L (11 mg/dL) para la muestra 1, de 818 µmol/L (15 mg/dL) para la muestra 2, de 1220 µmol/L (22 mg/dL) para la muestra 3 y de 2440 µmol/L (44 mg/dL) para la muestra 4. En la siguiente tabla se muestra un resumen de los resultados:

⁹ Estudio realizado en Wallac Oy, Turku, Finlandia.

	Recuperación %				
Muestras sobrecargadas con	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Valor medio
Galactosa (Gal)	77	78	84	77	79
Galactosa-1-fosfato (Gal-1-P)	83	84	82	77	82
Gal y Gal-1-P	83	80	81	78	81

Interferencia¹⁰: Una posible interferencia se analizó añadiendo la sustancia a la sangre total con una concentración baja de galactosa y analizando la galactosa en las manchas de sangre según el documento EP7-A del CLSI (13).

Las sustancias analizadas fueron glucosa (1200 mg/dL), manosa (1–10 mg/dL), fructosa (25 mg/dL), glutatión (0.06–60 mg/dL), ascorbato (0.1–3 mg/dL), bilirrubina (10–40 mg/dL), hemoglobina (20 y 25 g/dL), proteína BSA (12 g/dL), y acetaminofeno (0.1–1 mg/dL). Sólo el glutatión tuvo un efecto estadísticamente significativo en la detección de galactosa (véase la siguiente tabla). Una concentración de glutatión de 60 mg/dL provocó una reducción de aproximadamente un 45 % de la concentración aparente de galactosa. Las concentraciones menores de glutatión no tuvieron un efecto significativo en la detección de galactosa.

Sustancia	Concentración analizada	Conc. de galactosa antes de añadir la sustancia que se desea analizar (mg/dL)	Conc. de galactosa después de añadir la sustancia que se desea analizar (mg/dL)	Cambio porcentual de galactosa medida (%)	Cambio estadística-mente significativo
Glutatión	0.06 mg/dL	7.7	7.2	-6.05	N
Glutatión	0.6 mg/dL	7.7	7.1	-8.28	N
Glutatión	6 mg/dL	7.7	7.5	-2.88	N
Glutatión	60 mg/dL	7.7	4.3	-44.30	S

Además, se analizaron cuatro niveles de solución Intralipid¹¹ con los siguientes resultados:

Sustancia	Concentración analizada	Conc. de galactosa antes de añadir la sustancia que se desea analizar (mg/dL)	Conc. de galactosa después de añadir la sustancia que se desea analizar (mg/dL)	Cambio porcentual de galactosa medida (%)	Cambio estadística-mente significativo
Intralípido	0.25 g/dL	9.2	10.4	14%	S
Intralípido	0.5 g/dL	9.2	10.6	16%	S
Intralípido	0.75 g/dL	9.2	11.4	25%	S
Intralípido	1 g/dL	9.2	11.9	30%	S

¹⁰ Estudio realizado en Wallac Oy, Turku, Finlandia.

¹¹ Intralipid es una marca de fábrica de Fresenius Kabi AB.

Todos los niveles de concentraciones de la solución Intralipid tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la detección de galactosa. Las concentraciones de 0.25 g/dL a 1 g/dL provocaron un aumento de entre el 14 y el 30% en la concentración aparente de galactosa.

GARANTÍA

Los resultados aquí presentados se han obtenido por el procedimiento de ensayo indicado. Cualquier cambio o modificación en el procedimiento no recomendado por el fabricante puede afectar a los resultados, en cuyo caso Wallac Oy y sus filiales declinan cualquier responsabilidad y garantía otorgada, expresa o tácita, sobre la comercialización del producto y su uso.

En tal caso, Wallac Oy, sus filiales y sus distribuidores autorizados no asumen ninguna responsabilidad por los daños o perjuicios directos o indirectos.

REFERENCIAS

1. Fridovich-Keil, J.L. (2006): Galactosemia: The Good, the Bad, and the Unknown. *J. Cell Physiol.* **209**, 701-705.
2. DeClue, T.J., Malone, J.I., and Tedesco, T.A. (1991): Florida newborn screening for galactosemia. *J. Fla. Med. Assoc.* **78** (6), 369–371.
3. Levy, H.L., Sepe, S.J., Shih, V.E., Vawter, G.F., and Klein, J.O. (1977): Sepsis due to *Escherichia coli* in neonates with galactosemia. *N. Engl. J. Med.* **297**, 823–825
4. Levy, H.L., and Hammersen, G. (1978): Newborn screening for galactosemia and other galactose metabolic defects. *J. Pediatr.* **92**, 871–877.
5. Du, Ping, and Anumula, Kalyan R. (1998): Quantitative Analysis of Monosaccharides from Glycoproteins by Fast HPLC with Highly Sensitive Fluorescence Detection. *J. Biomol. Tech.* **9**, 31-33.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (2007): Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard – Fifth Edition; CLSI Document LA4-A5. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
7. Westgard, J.O., Barry, P.L., Hunt, M.R. and Groth, T. (1981): A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* **27**, 493–501.
8. Newborn Screening ACT Sheets and Algorithms. American College of Medical Genetics www.acmg.net/PDFLibrary/Galactose-ACT-Sheet.pdf.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004): Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS document EP5-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004): Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. NCCLS document EP17-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003): Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach; Approved Guideline. NCCLS document EP6-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002): Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS document EP9-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

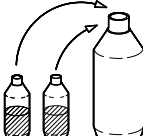
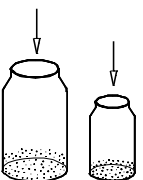
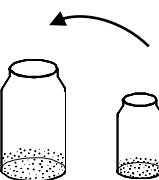
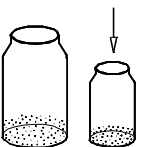
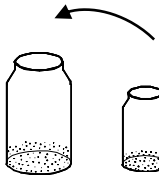
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (2005): Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Última revisión 10 de mayo de 2023

Neonatal Total Galactose kit 3029-0010

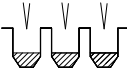
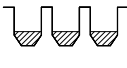
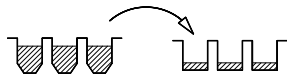
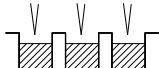
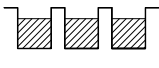
Protocolo resumido

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Solución de extracción		Sulfato de zinc 3 partes	Etanol 2 partes
Mezcla de tampón/agua		Agua desionizada 5 mL/placa	Tampón de reconstitución galactosa 5 mL/placa
Reconstituir reactivo de galactosa oxidasa y reactivo de sustrato de galactosa		Añadir 6 mL de tampón de reconstitución galactosa no diluido al vial de reactivo de galactosa oxidasa y 1 mL de tampón de reconstitución galactosa no diluido al vial de reactivo de sustrato de galactosa. Deje disolver durante 5 minutos.	
		Antes de realizar la transferencia, vuelva a tapar el vial e inviértalo hacia arriba y hacia abajo varias veces para disolver el reactivo de sustrato de galactosa completamente. Transferir el reactivo de sustrato de galactosa al vial de reactivo de galactosa oxidasa.	
		Lavar el vial de reactivo de sustrato de galactosa con 2 mL de tampón de reconstitución galactosa.	
		Transferir la solución al vial de reactivo de galactosa oxidasa. La solución debe utilizarse en un intervalo de 5-60 minutos después de la reconstitución.	

Continuación →

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Taladrar calibradores, controles y muestras		Utilizar una microplaca clara de transferencia con fondo en V
Añadir solución de extracción		15 µL, agitación lenta durante 1 min.
Incubar		60 (60–70) min. a T.A. sin agitar
Añadir mezcla de tampón/agua		80 µL, agitación lenta durante 1 min.
Transferir al pocillo correspondiente de la microplaca blanca		60 µL del contenido del pocillo
Añadir reactivo de galactosa oxidasa		75 µL, agitación lenta durante 1 min.
Incubar		60 (60–90) min. a T.A. sin agitar
Añadir solución de parada		100 µL, agitación lenta durante 1 min.
Medir	Mida utilizando la longitud de onda de excitación de 340 nm y la longitud de onda de emisión de 405 nm en el transcurso de 1 hora después de añadir la solución de parada	 GAO Con VICTOR™ 2D utilice la versión de software 1.12, revisión 2 o superior
Calcular los resultados	Calcule los resultados mediante regresión lineal.	Ver la sección “CÁLCULO DE RESULTADOS”

APÉNDICE 1

Regresión lineal

La regresión lineal utiliza el *método de mínimos cuadrados*. El método de mínimos cuadrados elige la línea de predicción

$$f(x) = \alpha + \beta x_i$$

que minimiza la suma de los errores de predicción al cuadrado.

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (f(x_i) - y_{ij})^2, \text{ donde}$$

n = número de calibradores del kit,

m = número de replicados de cada calibrador del kit,

y_{ij} = respuesta medida del punto de replicado j^o de un calibrador del kit i y

x_i = concentración del calibrador del kit i^o .

El método de mínimos cuadrados consiste en buscar las estimaciones α y β . Las estimaciones α y β se calculan por medio de las fórmulas siguientes

$$\alpha = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{y}_i}{n} - \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \beta \text{ mientras que}$$

$$\beta = \frac{\sum_{i=1}^n x_i \bar{y}_i - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n \bar{y}_i}{n}}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}}, \text{ donde}$$

n = número de calibradores del kit,

m = número de replicados de cada calibrador del kit,

$\bar{y}_i$ = respuesta medida del calibrador del kit i y

x_i = concentración del calibrador del kit i^o .