
INTERÉS CLÍNICO

El UMTEST GAL ha sido concebido para la cuantificación de Galactosa total (Galactosa y Galactosa-1-fosfato) en muestras de sangre de recién nacidos colectadas en papel de filtro. Los errores congénitos en el metabolismo de la Galactosa se caracterizan por altos niveles sanguíneos de Galactosa y sus metabolitos, los cuales son tóxicos al organismo (1). Estos se deben a la deficiencia de una de las tres enzimas que participan en el metabolismo de la Galactosa: Galactoquinasa (EC 2.7.1.6), Galactosa-1-fosfato Uridil Transferasa (EC 2.7.7.12) y UDP-Galactosa 4-Epimerasa (EC 5.1.3.2) (2). Producto de este defecto se acumula galactosa-1-fosfato, galactosa libre y galactitol en sangre y tejidos, los que provocan alteraciones hepáticas, renales y cerebrales. En todos se presentan signos y síntomas clínicos durante los primeros días de vida, tales como, vómito, diarrea, ictericia, hepatomegalia, cataratas, sepsis y ocasionalmente la muerte (3), el diagnóstico temprano y un rápido tratamiento, conducirán al desarrollo de una vida normal para un niño con posibilidad de padecer esta enfermedad.

La Galactosemia se transmite como un carácter autosómico recesivo, con una incidencia aproximada de 1:60 000 en recién nacidos, para el defecto enzimático más frecuente (Galactosa-1-fosfato Uridil Transferasa) (4). Se ha demostrado que la cuantificación de galactosa total a partir de muestras de sangre colectada sobre papel de filtro puede ser útil para la pesquisa neonatal de la Galactosemia (5).

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMTEST GAL es un ensayo enzimático que mide la concentración de Galactosa total presente en la muestra, a través de la fluorescencia emitida por el Nicotinamida-adenín-dinucleótido en su forma reducida (NADH+H producto de la acción de la enzima β -Galactosa Deshidrogenasa (EC 1.1.1.48). La adición de Fosfatasa Alcalina (EC 3.1.3.1), permite la transformación de la Galactosa-1-fosfato a Galactosa. Ambas reacciones enzimáticas ocurren en condiciones óptimas de pH y temperatura. La intensidad de la fluorescencia emitida por el NADH+H es directamente proporcional a la concentración de Galactosa total presente en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Código UMT 1006 (288 pruebas)

Contenido:

Placa de 12 tiras x 8 pocillos	3
Tarjeta con Calibradores y Control en sangre seca	3 x 3 curvas
R1: Solución Tampón	1 x 25 mL
R2: Coenzima	4 x Liofilizado
R3: Reactivo Enzimático A	1 x 0,5 mL
R4: Reactivo Enzimático B	1 x 0,5 mL

Los Calibradores y el Control han sido preparados con sangre humana con un valor de hematocrito del 55 % y dispensados sobre tarjetas de papel de filtro, el cual haya sido homologado por el Centro de InmunoEnsayo, para ser aplicado en tamizajes neonatales, utilizando el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA). El Control fue preparado a iguales concentraciones máxicas de galactosa y galactosa-1 fosfato.

Los reactivos R1, R3, R4, los Calibradores y el Control en sangre seca contienen azida sódica (0,1 g/L) como agente preservante.

Los Calibradores y el Control, son negativos a las pruebas de detección de Anti-VIH 1+2, HBsAg, Anti-VHC y Sífilis, no obstante, deben ser manipulados como materiales potencialmente infecciosos.

Preparación de las Soluciones de Trabajo:

R1: Listo para el uso. Para 4 tiras de 8 posiciones, use 1 300 μ L del reactivo.

R2: Reconstituya con 1,5 mL de R1. Permita su completa disolución Para 4 tiras de 8 posiciones, use 500 μ L del reactivo.

R3: Listo para el uso. Homogeneice antes de usar. Para 4 tiras de 8 posiciones, use 50 μ L del reactivo.

R4: Listo para el uso. Homogeneice antes de usar. Para 4 tiras de 8 posiciones, use 50 μ L del reactivo.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

-Todos los reactivos deben almacenarse de 2 a 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

- El reactivo R2: Coenzima, después de reconstituido puede ser dispensado en alícuotas, empleando frascos de color ámbar, de esta forma es estable durante los próximos tres días, si es almacenado de 2 a 8 °C, y durante siete días, si es almacenado a - 20 °C. Deseche las alícuotas una vez utilizadas.

-Después de abrir, los componentes serán estables durante 3 meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación. Las tarjetas con Calibradores y Control no utilizadas deben mantenerse en la bolsa suministrada, con el desecante y herméticamente cerradas.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada
- Metanol calidad reactivo
- Acetona calidad reactivo
- Hipoclorito de sodio
- Pipetas Multicanal con puntas desechables para 10 µL
- Pipetas de precisión entre 10 y 5 000 µL
- Placas o tubos para realizar la elución e incubación con la mezcla de reactivos
- Agitador de placas
- Incubadora de 37 ± 1 °C
- Papel absorbente

PRECAUCIONES

- No incorpore remanentes de reactivos a los frascos originales.
- La mezcla Metanol-Acetona-Agua debe ser usada inmediatamente después de su preparación. No almacene la mezcla, ni reutilice.
- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos se encuentren a temperatura de trabajo del laboratorio y que el Reactivo R2 una vez preparado según las instrucciones, se encuentre completamente disuelto.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen la Coenzima.
- Utilice puntas nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones. Use puntas limpias o nuevas para la transferencia de las muestras hacia la placa de ultramicroELISA.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro no deben permanecer fuera de la temperatura de almacenamiento orientada por más de una semana. Almacenadas de 2 a 8 °C son estables durante nueve meses (6).

-Manipule los Calibradores, el Control, el componente R3, Reactivo Enzimático A y las muestras como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.

-Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con la muestra como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.

- Cuando se observe opacidad en las placas de microtitulación, debido al uso reiterado de los solventes orgánicos utilizados en la extracción, deseche las placas.

-Verifique que las tiras de reacción estén fijadas correctamente en el soporte.

-Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.

-Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo.

-El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

-Los reactivos del UMTEST GAL de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TECNICO

1.-Preparación de la Mezcla Metanol-Acetona-Agua destilada.

Tiras de 8 posiciones	Cantidad de Metanol (mL)	Cantidad de Acetona (mL)	Cantidad de Agua destilada (mL)
4 tiras	0,60	0,60	0,35
8 tiras	1,20	1,20	0,70
12 tiras	2,40	2,40	1,40

2.-Preparación de los Calibradores, el Control y las muestras.

Corte con un perforador para papel, un disco de 3 mm en la mancha de sangre. Deposítelo en un recipiente apropiado (placa de microtitulación o similar) y añádale 30 μ L de la mezcla Metanol-Acetona-Agua destilada. Incube durante una hora a una temperatura entre 20 y 25 °C con agitación (900 -1000 r.p.m) y sin tapar para facilitar la evaporación. Los Calibradores, el Control del ensayo y las muestras deben ser agitados para garantizar una mejor elución de los analitos a determinar.

3.-Preparación y adición de la mezcla de reacción.

Mezcle las soluciones de trabajo (R1+R2+R3+R4) preparadas previamente en una proporción (26:10:1:1). Añada 50 μ L de la mezcla de reacción (R1+R2+R3+R4) a las muestras, Calibradores y Control y agite momentáneamente (30 a 60 segundos) evitando la formación de espuma.

4.-Incubación.

Incube las muestras, Calibradores y Control durante una hora a 37 °C en cámara húmeda bien cerrada previamente equilibrada a esa temperatura.

5.-Transferencia de las muestras, Calibradores y Control a las tiras de reacción.

Transfiera 30 µL de la mezcla incubada a cada pocillo de las tiras de reacción de las placas ultramicroELISA. Se seguirá el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	E	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	A	E	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	B	F	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	B	F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	C	CB	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	C	CB	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	D	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	D	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Las concentraciones aproximadas de los Calibradores y Control son las siguientes:

Calibrador A (Mezcla de reactivos sin disco de papel): 0 mmol/L de Galactosa en sangre total

Calibrador B: 0,168 – 0,392 mmol/L de Galactosa en sangre total

Calibrador C: 0,448 – 0,672 mmol/L de Galactosa en sangre total

Calibrador D: 0,952 – 1,288 mmol/L de Galactosa en sangre total

Calibrador E: 2,072 – 2,408 mmol/L de Galactosa en sangre total

Calibrador F: 3,640 – 4,200 mmol/L de Galactosa en sangre total

Control CB: Control del ensayo

Las concentraciones de los Calibradores y el Control se especifican en cada lote.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado.

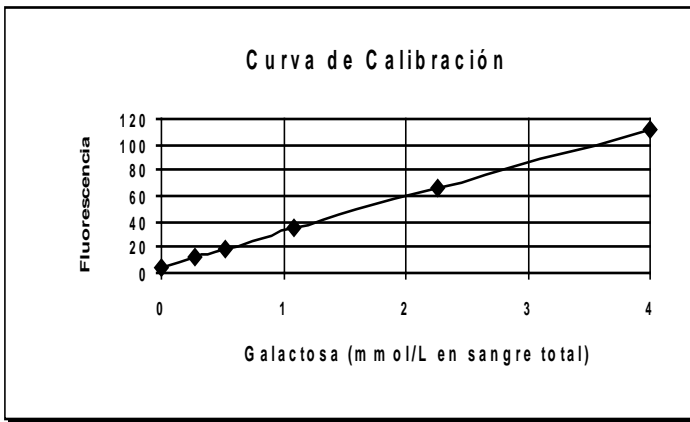
En ese caso, si utiliza el programa UMTEST GAL para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

5.-Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA. La lectura puede efectuarse hasta 5 minutos después de transferida la mezcla hacia la placa de Ultra Micro ELISA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Los valores de fluorescencia de los Calibradores se interpolan de forma lineal en un gráfico contra concentración de Galactosa correspondiente a los Calibradores de la curva. Los resultados se obtienen en mmol/L y en mg/dL de Galactosa en sangre total.



-La validación, interpretación e impresión de los resultados, son realizados automáticamente por el programa Strips Reader Software (SRS)

. Si no dispone del mismo, la interpretación de los resultados se realiza interpolando los valores de fluorescencia de las muestras sobre la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

I. La curva de calibración debe cumplir las siguientes condiciones:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada Calibrador (A-F) debe proporcionar un incremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II. El valor de concentración calculado para el Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo. Al usar el programa, asegúrese que se han introducido en su computadora, como datos de referencia, los valores establecidos para los Calibradores y el Control de calidad correspondientes al lote.

III. Al evaluarse las muestras por duplicado, se rechazan los resultados de las mismas cuando uno de los valores es mayor y el otro menor que el nivel de corte; si se cumple que la diferencia entre ambos es mayor o igual que un 30 % con respecto al valor promedio.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre las poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Generalmente se acepta como nivel de corte de referencia 0,56 mmol/L (10 mg/dL) de Galactosa total en sangre. Las muestras que presentan una concentración superior son consideradas como elevadas.

Factor de conversión:

Galactosa: 0,056 mmol/L= 1mg/dL

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

1. PRECISION.

La precisión del ensayo se calculó evaluando muestras comprendidas en tres niveles de concentraciones de Galactosa: alto, medio y bajo.

Precisión del UMTEST GAL

Galactosa (mmol/L de sangre total)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n= 10)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
0,44	0,04	9,09	0,04	9,54
0,72	0,05	6,94	0,05	7,50
1,02	0,06	6,20	0,07	7,25

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

2. EXACTITUD.

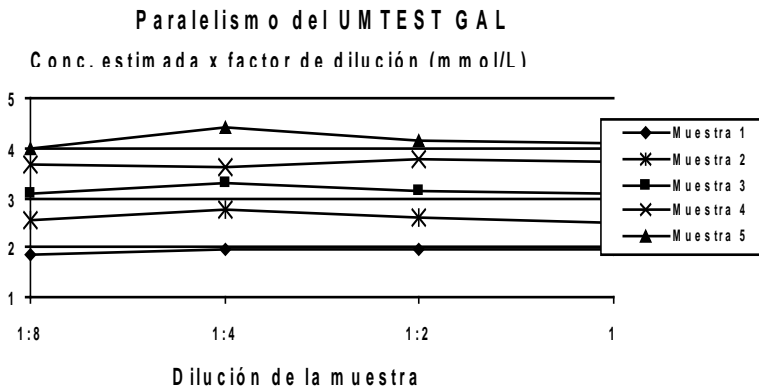
El porcentaje de recuperación obtenido al añadir diferentes cantidades de Galactosa a tres muestras de sangre de concentración conocida, antes de ser colectadas sobre papel de filtro, promedió $98,0 \pm 4,1$ %.

Recuperación del UMTEST GAL

Muestras	Valor Esperado Galactosa (mmol/L de sangre total)	Valor Obtenido Galactosa (mmol/L de sangre total)	Recuperación (%)
1	0,34	0,32	95,2
2	0,67	0,69	102,7
3	1,34	1,29	96,0

3. PARALELISMO.

Se realizaron diluciones seriadas a muestras de sangre con cinco concentraciones diferentes de Galactosa antes que fueran depositadas sobre papel de filtro. Las concentraciones calculadas de estas diluciones, a partir de las correspondientes manchas de sangre seca sobre papel de filtro, después de la corrección con el factor de dilución, difirieron en un $\pm 5,4$ % con respecto a la concentración original en la muestra pura.



4. DETECTABILIDAD.

La relación lineal de respuesta a bajas concentraciones permitió estimar que la concentración mínima detectable es de 0.06 mmol/L. El límite de detección es definido como la menor cantidad de galactosa presente en una muestra que puede ser detectada con una probabilidad del 95 %. El límite de cuantificación, definido como la menor cantidad de galactosa presente en una muestra que puede ser cuantificada con una precisión y exactitud aceptables, fue de 0,12 mmol/L (7).

5. ESPECIFICIDAD.

Se evaluó la reactividad cruzada con análogos estructurales de la Galactosa y con algunos antibióticos en las condiciones normales del ensayo.

Sustancias	Galactosa Basal (mmol/L)	Cantidad añadida (mmol/L)	Galactosa observada (mmol/L)
Glucosa	0,47	11,2	0,41
Sacarosa	0,47	5,6	0,39
Ribosa	0,47	5,6	0,42
Glucosa 6P	0,47	11,2	0,39
Fructosa	0,47	5,6	0,42
Xilosa	0,47	5,6	3,12
Galactosa 1P	0,47	1,12	1,75
Maltosa	0,47	5,6	0,35
Glucosa 1P	0,47	11,2	0,41
Fructosa 6P	0,47	5,6	0,40
Acido Ascórbico	0,47	0,14	0,47
Penicilina	0,47	5,6	0,4
Oxacilín	0,47	5,6	0,54
Gentamicina	0,47	5,6	0,48
Sulfametoxazol	0,47	5,6	0,52
Cloranfenicol	0,47	5,6	0,47

Se evidencia que no existe interferencia en el ensayo con las sustancias evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Won, G.N., Kawamura, M., and Donnell, G.N., Galactosemia screening: Methodology and outcome from worldwide data collection. In : Therrell, B.L. (ed.), *Advances in Neonatal Screening*, Elsevier Science Publishers B. V., New York, NY, pp. 243-249, 1987.
- 2.-Paigen, K., Pacholec, F., Levy, H., A new method of screening for inherited disorders of galactose metabolism. *J. Clin. Lab. Med.*, 99:895, 1982.
- 3.-Avery M.E. et al: Enfermedades del Recién Nacido. Trastornos congénitos del metabolismo de los hidratos de carbono. *Galactosemia*, vol1, 1981.
- 4.-Fujimura, Y., Ishii, S., Kawamura, M., Naruse, H., Simultaneous quantitative estimation of galactose-1-phosphate and galactose in blood for the diagnosis of galactosemia. *Tohoku J J Exp Med* 1982;137:289-95.
- 5.-Fujimura, Y., Ishii, S., Kawamura, M., Naruse, H., Microdeterminación of galactose and galactose-1-phosphate in dried blood spots. *Anal Biochem.*, 1981; 117:187.
- 6.- Elves, L.H., Loeber, J.G., The need for standarized bloodspot TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. *Early Human Development* 45: 179-190, 1996.
- 7.-CLSI. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. CLSI document EP17-A. 940 West Valley Road, Suite 1400, 326 Wayne, PA 19087-1898: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.

Edición No. 3
Julio 31, 2013

UMTEST GAL

Código UMT 1006

Centro de InmunoEnsayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653,
La Habana, CUBA. Telef.: 208-2929. Fax: (537) 208-6514