


¿Le gustaría
determinar la xilosa
de una forma
sencilla?

Sí

No



INDICE

1. Introducción-Definición
 2. Recepción de la muestra
 3. Preparación de soluciones
 4. Preparación de curva patrón y muestras de orina
 5. Medición de absorbancia
 6. Introducción de resultados en hoja Excel
 7. Validación del método de medida de xilosa en orina
 8. Material y proveedores
- 

1. Introducción-Definición

La determinación de xilosa se realiza por el método de floroglucinol.

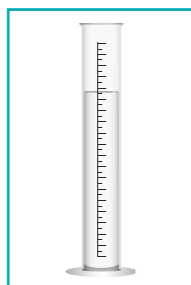
El método consiste en una determinación espectrofotométrica de un compuesto coloreado formado entre el reactivo floroglucinol (1,3,5-OH-benceno) y el furfural, el cual es el producto de la reacción de la xilosa en un medio fuertemente ácido.

A continuación se incluye el Protocolo validado para la determinación de la xilosa en muestras de orina de pacientes que han recibido el Test de Gaxilosa, así como las recomendaciones para el tratamiento y la conservación de las muestras, materiales, puntos importantes a considerar y recomendaciones para entregar a pacientes.

2. Recepción de la muestra



1º Medir el VOLUMEN TOTAL de orina (imprescindible probeta)



2º Realizar alícuotas (1-2 mL/alícuota no más de 2-3 alícuota)



Si las muestras de orina se procesan en el mismo día de su recogida:

- La xilosa en orina permanece estable a 4° C durante 24 h.
- La xilosa en orina permanece estable a temperatura ambiente durante 8 h.

Si las muestras de orina se procesan en otro día posterior al de su recogida:

- Congelar la muestra de orina inmediatamente tras su recogida. La xilosa en orina es estable a -20° C y -70° C durante 2 meses, hasta 3 ciclos de congelación/descongelación.

3. Preparación de soluciones

1º Solución de xilosa para la curva patrón (estable 6 meses a -20° C)

1a. Preparar solución de 100 mg/dl de xilosa en agua destilada (imprescindible utilizar balanza de precisión)

1b. A partir de la anterior, hacer dilución 1:10 en agua destilada (10 mg/dl)

2º Reactivo floroglucinol (estable 5 h, el floroglucinol es sensible a la luz) (prepararlo en el momento de su uso)



Controlar la fecha de caducidad de los ácidos
Disolver el floroglucinol en ácido acético y añadir el ácido clorhídrico al final

Tabla orientativa de cantidad de reactivo de floroglucinol a preparar según volumen de muestras a analizar:

Muestras (n)	10	25	50	75	100	200
Floroglucinol (g)	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	2,0
Ácido acético glacial (ml)	20	50	100	150	200	400
Ácido clorhídrico (ml)	2,0	5	10	15	20	40



Ejemplo: Cantidad de reactivos necesarios para procesar 50 muestras

- 0,5 g de floroglucinol (en balanza analítica)
- 100 ml de ácido acético glacial
- 10 ml de ácido clorhídrico 37%

- El reactivo de floroglucinol se debe administrar con frasco dispensador.
- Una vez procesadas con reactivo de floroglucinol, las muestras son estables durante 3 horas.

4. Preparación de curva patrón y muestras de orina



1º Rotular los tubos de la curva patrón con las distintas concentraciones de xilosa y los tubos de las muestras por duplicado (ver tablas A y B del punto 2º)



CURVA PATRÓN



MUESTRAS

2º Preparar los puntos de la curva patrón y de las muestras, según la siguientes tablas. En todos los casos, añadir primero el agua destilada, después la xilosa o la orina que queremos analizar y, por último, el reactivo floroglucinol.

A. Curva patrón. Volumen final de los tubos = 2 ml

Xilosa mg/dl	0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5
Agua destilada (µl)	100	97,5	95	90	80	60	20	0
Xilosa 10 mg/dl (µl)	0	2,5	5	10	20	40	80	100
Reactivo floroglucinol (ml)	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9

B. Muestras. Volumen final de los tubos = 2 ml

Muestras orina	Muestra "n"
Agua destilada (µl)	50
Muestra orina (µl)	50
Reactivo floroglucinol (ml)	1,9



Hacer 2 determinaciones por cada muestra, para mayor exactitud del análisis.

Tener cuidado en no dejar gotas en las paredes de los tubos. Para ello es conveniente llegar con la punta de la pipeta hasta el fondo del tubo antes de vaciar completamente su contenido.

Muestras de orina

Recomendaciones

Muy concentradas
(Diuresis <100 ml)



Diluir la muestra 1:10

Concentradas
(Diuresis 100-200 ml)



Diluir la muestra 1:5

Normal
(Diuresis 200-1000 ml)



NO Diluir

Muy diluidas
(Diuresis >1000 ml)



Utilizar 100 µl de orina



Cambiar la punta de la micropipeta con cada muestra de orina.

Centrifugar previamente las muestras de orina con sedimento (3 minutos a 5000 rpm) y usar el sobrenadante para las determinaciones.

Desarrollo de la reacción

- Poner los tubos en una gradilla e introducirlos en un baño a 100°C durante 4 min EXACTOS.
- Mientras transcurren los 4 min, tener preparado un baño frío para, pasados éstos, introducir inmediatamente la gradilla con los tubos y parar así la reacción. Dejar en baño frío 5 min.

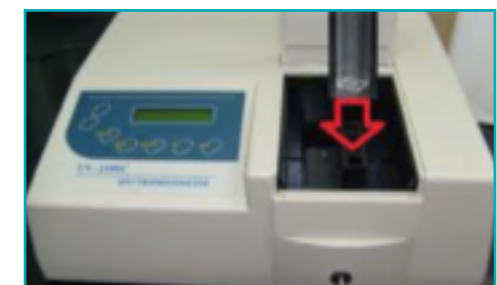
5. Medición de absorbancia a 554 nm

Medir la absorbancia de cada punto de la curva patrón y de cada muestra.



Se utilizaran cubetas MACRO

Cubeta macro para espectrofotómetro fabricado en plástico, vidrio o cuarzo (transparente a la luz ultravioleta). Las cubetas deben ser tan claras o transparentes como sea posible, sin impurezas que puedan afectar a una lectura espectroscópica.



6. Introducción de resultados en hoja Excel

Ferrer facilitará una hoja de calculo donde a partir de las absorbancias obtenidas se calculará el valor de xilosa en las muestras analizadas

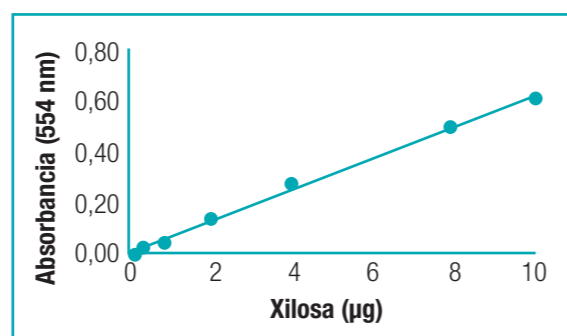
Cuantificación de xilosa en orina y resultados



Curva patrón de xilosa

Xilosa mg/dl	0	0,0125	0,025	0,05	0,10	0,20	0,40	0,50
Xilosa (µg)	0	0,25	0,5	1	2	4	8	10
Abs. 554 nm	0	0,006	0,037	0,073	0,165	0,307	0,523	0,627

INTERSEP.	PENDIEN.	R2
0,0127	0,0636	0,992



Muestras	Volumen muestra (µl)	Absorbancia muestra (554 nm)	Xilosa muestra (mg)	Concentr. muestra (mg/dl)	Concentr. muestra (mg/ml)	Dilución	Concentr. final (mg/ml)	Volumen total orina (ml)	Xilosa total (mg)	Promedio xilosa (mg)
Muestra 1	50	0,300	4,52	9,041	0,090	1	0,090	650	58,77	58,56
	50	0,298	4,49	8,978	0,090	1	0,090		58,36	

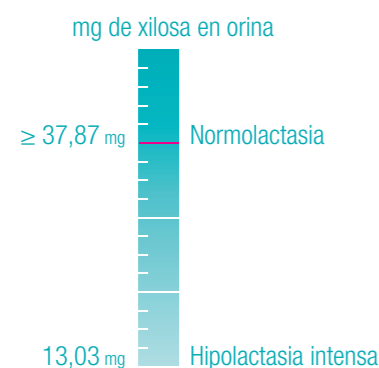
Valores normales en adultos

Test	Xilosa en orina (mg)
LacTEST 0,45 g (0-5 h)	≥ 37,87

Valores por debajo de este límite significan hipolactasia

Cuantificación de xilosa en orina

Los resultados de su análisis de orina muestran unos niveles de xilosa de:



Nombre paciente:
 Nº de historia clínica:
 Resultado xilosa: **58,56**

Etiqueta paciente

Este es un valor normal en adultos, por lo que no hay evidencia de hipolactasia

7. Validación del método de medida de xilosa en orina

Rango de la curva de calibración	0,0125 a 0,5 mg/dL
Linealidad	$y = 1,2225x + 0,0095$ $r^2 > 0,9997$
Sensibilidad	El límite de cuantificación para las muestra en orina es 0,0125 mg/dl
Reproducibilidad	El Coeficiente de Variación (CV) entre las diferentes muestras no debe ser mayor al 15%
Exactitud	El CV entre las diferentes muestras no debe ser superior al 15%
Error en la medida	0,48 – 6,45 %

8. Proveedores y material recomendado

Las CASAS COMERCIALES de los reactivos son las siguientes:

- **Floroglucinol (1,3,5-trihydrobenzene)** es de la casa comercial Sigma P3502-100G. Sigma tiene dos presentaciones una de 25 g que cuesta 29,40 € y la referencia es P3502-25G y otra de 100 g que cuesta 92,30 € y la referencia es P3502-100G.
- El floroglucinol tiene una caducidad de unos tres años según la casa que lo venda y es perfectamente estable en solido durante ese tiempo.
- **Ácido acético glacial:** Prolabo 20103.295 o cualquier otra casa pero siempre PURO (los de Prolabo venden el litro en 15 € aproximadamente, pero si se compran muchas unidades sale mucho más económico).
- **Ácido clorhídrico al 37%.** Esto se compra así, no hay que diluirlo. La casa puede ser Merck 1.00317.1000 o cualquier otra casa (los de Prolabo venden el litro en 25 € aproximadamente, pero si se compran muchas unidades sale mucho más económico, recuerda que este se utiliza muy poco).
- **Xilosa:** Panreac o Sigma o cualquier otra casa. No es un kit, es un reactivo tal cual. 500 g cuesta en Sigma 147 €, pero pueden comprar mucho menos, ya que se prepara una solución de 10 mg/dL para la curva patrón que pueden congelar durante 6 meses.

Balanza

analítica para pesar el floroglucinol y la xilosa



Colorímetro o espectrofotómetro

en nuestro caso la longitud de onda necesaria es 554 nm



Probetas de 100 ml y 50 ml



Micropipetas

- 0.5-10 µl
- 10-100 µl
- puntas desechables



Baño termostático

que llegue a 100 °C



Dispensador de ácidos

- Dosificador acoplable a frascos para reactivos.
- Permite dosificar directamente desde frascos.
- Se puede desmontar de manera sencilla para la limpieza.
- Esta provisto de válvulas de aspiración reemplazables.



▼ Este medicamento está sujeto a seguimiento adicional, lo que realizará la detección de nueva información sobre su seguridad. Se invita a los profesionales sanitarios a notificar las sospechas de reacciones adversas. Ver la sección 4.8, en la que se incluye información sobre cómo notificarlas.

1. NOMBRE DEL MEDICAMENTO LacTEST 0,45 g polvo para solución oral. **2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA** Un sobre contiene 0,45 g de gaxilosa. Para consultar la lista completa de excipientes ver sección 6.1. **3. FORMA FARMACÉUTICA** Polvo blanco o casi blanco para solución oral. **4. DATOS CLÍNICOS** **4.1 Indicaciones terapéuticas** Este medicamento es únicamente para uso diagnóstico. LacTEST-Testa indicado para diagnóstico de hipolactasia en adultos y en pacientes ancianos que presenten síntomas clínicos de intolerancia a la lactosa. **4.2 Posología y forma de administración** Este medicamento debe estar prescrito por un gastroenterólogo y solo debe ser administrado por un profesional sanitario debidamente autorizado y bajo adecuada supervisión médica. Posología En adultos, se administran por vía oral 0,45 g de gaxilosa. Población anciana El uso de LacTEST no está recomendado en pacientes ancianos con función renal anormal (demostrado previamente por la medida de la tasa de filtración glomerular, TFG <90 ml/min/1,73 m²), ya que la excreción renal de xilosa puede estar reducida y la seguridad y eficacia de LacTEST no han sido establecidas. Población pediátrica La seguridad y eficacia de LacTEST en niños de 0 a 18 años de edad, no han sido establecidas. No hay datos disponibles. Pacientes con insuficiencia renal La seguridad y eficacia de LacTEST en pacientes con insuficiencia renal no han sido establecidas. En los pacientes con enfermedad renal grave, el uso de LacTEST está contraindicado (ver sección 4.3) **4.3 Contraindicaciones** Pacientes con insuficiencia hepática La seguridad y eficacia de LacTEST en pacientes con insuficiencia hepática no han sido establecidas. En los pacientes con hipertensión portal (ascitis, cirrosis), el uso de LacTEST está contraindicado (ver sección 4.3) **4.4 Advertencias y precauciones especiales de empleo** Población pediátrica Precauciones a considerar antes de manipular o administrar este medicamento Después de la reconstitución del producto disuelto en agua, se obtiene una solución clara e incolora. La realización de la prueba debe seguir la siguiente secuencia: el paciente debe vaciar su vejiga dos horas antes del comienzo de la prueba, y de nuevo entre los 15 y 30 minutos previos al comienzo de la misma. LacTEST será administrado. A partir de este momento, el paciente debe beber hasta un máximo de 500 ml de agua para facilitar la diuresis y recoger la orina acumulada en las 5 horas de duración de la prueba en un recipiente adecuado asegurándose de vaciar la vejiga antes de finalizar la prueba. Esto permitirá determinar la cantidad de xilosa acumulada en orina de 0 a 5 horas. Si el paciente vomita durante la realización de la prueba es necesario repetirla. Si es necesario repetir la prueba, no debe hacerse hasta pasados 3 días. Para la preparación del paciente, ver sección 4.4 Para consultar las instrucciones de reconstitución del medicamento antes de la administración y las instrucciones de uso, ver sección 6.6. **4.5 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción** No se han realizado estudios de interacción. Debido a que se ha descrito que la aspirina y la indometacina disminuyen la excreción de xilosa en la orina, a los pacientes se les pedirá que no tomen estos medicamentos al menos desde 48 horas antes de la realización del test de gaxilosa hasta la finalización de la prueba. Población pediátrica Los estudios de interacción solamente se han realizado en adultos. **4.6 Fertilidad, embarazo y lactancia** Embarazo No se prevén efectos durante el embarazo, ya que la exposición sistémica a gaxilosa es insignificante. LacTEST se puede utilizar durante el embarazo. Lactancia No se prevén efectos durante la lactancia, ya que la exposición sistémica a gaxilosa es insignificante. LacTEST se puede utilizar durante la lactancia. **4.7 Efectos sobre la capacidad para conducir y utilizar máquinas** La influencia de LacTEST sobre la capacidad para conducir y utilizar máquinas es nula o insignificante. **4.8 Reacciones adversas** El programa clínico de gaxilosa consta de 3 estudios, que representan 540 sujetos que recibieron gaxilosa vía oral (113 mg - 5,4 g) y 12 recibieron placebo. Las investigaciones utilizando el test de gaxilosa mostraron un perfil de seguridad aceptable en voluntarios sanos y en la población de destino. No se han descrito efectos adversos graves, ni efectos que fueran causa de retirada del estudio. Solamente 13 efectos adversos fueron considerados como probable o posiblemente relacionados con el producto en investigación, y ninguno de ellos dio lugar a la retirada. Cuatro de ellos fueron de intensidad moderada (prurito y urticaria) y 9 fueron leves (distensión abdominal, dolor abdominal, vómito, diarrea, náuseas y migraña). **4.9 Sobredosis** Debido al hecho que solo se ingieren 0,45 g de gaxilosa, no es esperable una sobredosis. **6. DATOS FARMACÉUTICOS** **6.1 Lista de excipientes** Ninguno **6.2 Incompatibilidades** Este medicamento no debe mezclarse con otros medicamentos **6.3 Período de validez** Sobres cerrados: 1 año Una vez reconstituido, la suspensión debe usarse inmediatamente. **6.4 Precauciones especiales de conservación** Sobres cerrados. Este medicamento no requiere condiciones especiales de temperatura para su almacenamiento. Mantener el sobre en la caja. Para condiciones de almacenamiento después de la reconstitución, ver sección 6.3. **6.5 Naturaleza y contenido del envase** Envase con un sobre de un solo uso. Sobres formados por una hoja de PVC y una lámina de Alu/Suri/Opalina, conteniendo 0,45 g de gaxilosa. **6.6 Precauciones especiales y otras manipulaciones** Con mucho cuidado disuelva todo el contenido del sobre en unos 100 ml de agua. Se obtiene una solución clara e incolora. El paciente debe tomar inmediatamente la solución y registrar la hora de inicio de la prueba. Se recogerá la orina total desde 0 a 5 horas. La medida de los niveles de xilosa en orina acumulada de 0-5 horas se hará por el método validado de floroglucinol descrito a continuación. Los pacientes con una cantidad total de xilosa excretada en orina de 0-5 horas igual o superior a 37,87 mg de xilosa son considerados como normolactásicos. Si la cantidad de xilosa es menor que el valor anterior, el paciente es considerado hipolactásico. La eliminación del medicamento no utilizado y de todos los materiales que hayan estado en contacto con él, se realizará de acuerdo con la normativa local. Análisis de las muestras y especificaciones del ensayo para los laboratorios. La determinación de xilosa se realiza por el método de floroglucinol. El método consiste en una determinación espectrofotométrica de un compuesto coloreado formado entre el reactivo floroglucinol (1,3,5-OH-benceno) y el furfural, el cual es el producto de la reacción de la xilosa en un medio fuertemente ácido. Se incluye un protocolo validado para la determinación de xilosa en muestras de orina de pacientes, que han recibido LacTEST 0,45 g, así como las recomendaciones para el tratamiento y la conservación de las muestras. **Protocolo de determinación de Xilosa** Preparar: a) Solución de xilosa 6,66 mM (100 mg/dl) en agua Milli Q. A partir de esta solución, se prepara la de 0,66 mM (10 mg/dl), que se utilizará en las curvas de calibración. b) Reactivo de color con floroglucinol: • 0,5 g floroglucinol • 100 ml ácido acético glacial • 10 ml ácido clorhídrico. Esta mezcla es suficiente para procesar 50 muestras (50 tubos) y se debe preparar en el momento de ser usada. Una vez preparada la mezcla no debe utilizarse pasadas 5 horas. c) Preparar una curva patrón de xilosa dentro del rango de 0,0125 a 0,5 mg/dl (0,25 a 10 µg). La curva patrón se expresa tanto en mg/dl como en µg de xilosa, debido a que los resultados de xilosa en orina se expresan en cantidad total (mg) referidos al volumen de orina recolectada de cada paciente durante la prueba (se utiliza la unidad de cantidad debido a que el diagnóstico en orina se expresa como la cantidad total de xilosa presente en orina). La solución estándar de xilosa se debe preparar fresca en el día, es decir cuando se vayan a realizar las medidas de xilosa en las muestras. Una vez preparada la solución estándar de xilosa no debe utilizarse pasadas 5 horas de su preparación.

	Curva estándar de xilosa							Muestras				
Xilosa, mg/dl	0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5				
Xilosa, µg	0	0,25	0,5	1	2	4	8	10				
Xilosa 10 mg/dl (µl)	-	2,5	5	10	20	40	80	100	-	-	-	-
Orina (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	25	50	75	100
Agua Milli Q (µl)	100	97,5	95	90	80	60	20	-	75	50	25	0
Reac. floroglucinol (ml)	1,9 mL	→										

• Se usan tubos de polipropileno de 10 ml, resistentes a ácidos y calor. Se añaden las muestras. Se hace una curva patrón de xilosa, la cual se prepara con las cantidades indicadas anteriormente. • Se añade a cada tubo el reactivo de color con floroglucinol hasta completar un volumen de 2 ml. • Se incuban a 100°C en un baño durante 4 minutos exactos y se enfrían en agua. • Se mide absorbancia a 554 nm en un colorímetro o espectrofotómetro inmediatamente después de enfriar la reacción. • El espectrofotómetro se ajusta a cero de absorbancia, con el blanco reactivo que contiene agua y reactivo floroglucinol, antes de leer la curva patrón y las muestras. Este blanco reactivo debe tratarse del mismo modo que las muestras a valorar. • Cálculos: la concentración de xilosa en las muestras de orina, se calcula extrapolando los valores desde la curva de calibración. El valor del volumen total de orina recogido durante las 5 horas que dura la prueba debe quedar registrado, para calcular la cantidad total de xilosa en orina de 5 horas.

Valores normales en adultos	
Prueba	Xilosa en orina (mg)
LacTEST 0,45 g	≥ 37,87

Valores por debajo de 37,87 significa hipolactasia Nota: Aspectos a considerar en cuanto a la conservación de las muestras de orina 1-Se recomienda guardar las muestras de orina para la medida de xilosa, a 4°C si la determinación se va a realizar en el día; o de otro modo, cuando la determinación de xilosa se fuera a realizar otro día, las muestras se almacenan a -20°C o -70°C (las muestras congeladas son estables al menos hasta dos meses). 2-Si fuese necesario repetir la medida, las muestras pueden ser congeladas y descongeladas hasta tres veces en un periodo de 2 meses. Aspectos a considerar en cuanto a la solución de trabajo y al procesamiento de las muestras. 1. El reactivo color de floroglucinol sólo es estable durante las primeras 5 horas de su preparación. 2. Una vez que las muestras han sido procesadas por calentamiento en presencia del reactivo floroglucinol, las muestras son estables durante las tres primeras horas después de la preparación.

Validación del método de determinación de xilosa en orina	
Rango de la curva de calibración:	0,0125 a 0,5 mg/dl (0,25 a 10 µg)
Linealidad:	y = 1,2225x + 0,0095 r ² > 0,9997
Sensibilidad:	El límite de cuantificación para la muestra en orina y sangre es 0,0125 mg/dl.
Reproducibilidad:	El CV entre las diferentes muestras no debe ser mayor al 15%.
Exactitud:	El CV entre las diferentes muestras no debe ser superior al 15%.
Error en la medida:	0,48 - 6,45 %

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN Azalea, 1 - 28109 Alcobendas (Madrid) - ESPAÑA **8. NÚMERO(S) DE AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN** 75797 **9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN/RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN.** 19-4-2012 **10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO.** Noviembre 2012 **11. RÉGIMEN DE PRESCRIPCIÓN Y DISPENSACIÓN POR EL SISTEMA NACIONAL DE SALUD.** Con receta médica. Diagnóstico Hospitalario. Su dispensación se limita, sin necesidad de visado, a los pacientes no hospitalizados, en los Servicios de Farmacia de los Hospitales. El envase irá desprovisto del cupón precinto. **12. PRECIOS Y CÓDIGO NACIONAL.** CN: 689247; PVP: 67,55€, PVP IVA: 70,25€. Sin aportación.

La información detallada de este medicamento está disponible en el sitio web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). <http://www.aemps.gob.es/>

1. Ficha técnica LacTEST.
2. Heyman MB; Committee on Nutrition. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. Pediatrics. 2006 Sep;118(3):1279-86.
3. Bayless TM, Christopher NL. Disaccharidase deficiency. Am J Clin Nutr. 1969 Feb;22(2):181-90.
4. Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Management and treatment of lactose malabsorption. World J Gastroenterol. 2006 Jan 14;12(2):187-91.

LacTEST

da respuesta

- Mide la actividad de la lactasa intestinal¹
- Comportamiento diagnóstico superior al de los test estándar^{*2,3}
sensibilidad y especificidad superiores al 90%
- Cómodo para sus pacientes^{2,3}
método no invasivo
- Sencillo^{2,3}
fácil realización e interpretación
- Coste-efectivo⁴
opción más efectiva y menos costosa para el diagnóstico de la hipolactasia^{**}



LAC1-XXX

 **ferrer** | Farma Hospital

Lac **TEST**
Gaxilosa
D A R E S P U E S T A

* Test de hidrógeno y glucemia. **Frente test de hidrógeno, glucemia y biopsia intestinal