



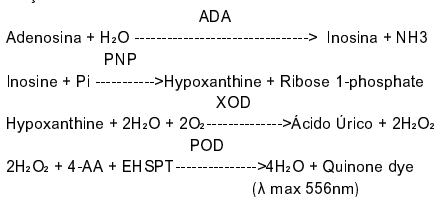
QUIMIADA ADENOSINA DEAMINASE

Finalidade:

Reação cinética para determinação quantitativa da atividade da Deaminase de Adenosina (ADA) em amostras de soro, plasma, líquido pleural e líquido de humanos. "Somente para uso diagnóstico in Vitro".

Princípio:

O ensaio de ADA está baseado na desaminação enzimática de adenosina à inosina que é convertido a hipoxantina através da fosforilase do nucleosido purina (PNP). A hipoxantina é convertida então à ácido úrico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da xantina oxidase (XOD). O H₂O₂ reage mais adiante com N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (EHSPT) e 4-aminoantipirina (4-AA) na presença de peroxidase (POD) para gerar pigmento de quinona que é monitorado de maneira cinética. O esquema de reação enzimático inteiro é mostrado abaixo.



Uma unidade de ADA está definida como a quantidade de ADA que gera um µmol de inosina da adenosina por minuto a temperatura de 37°C.

Metodologia:

Desaminação Enzimática

Significado Clínico:

A ADA é uma enzima que catalisa a reação de desaminação da adenosina para inosina. A enzima é distribuída amplamente em tecidos humanos, especialmente alta nos linfócitos T. A atividade de ADA elevado no soro foi observada em pacientes com hepatites agudas, fibroses hepáticas alcoólicas, hepatites ativas crônicas, cirrose do fígado, hepatites viral e hepatoma (1,2). A atividade de ADA aumentada também foi observada em pacientes com efusões tuberculosas (3). A determinação da atividade de ADA em soro de paciente pode acrescentar valores sem igual ao diagnóstico de doenças do fígado em combinação com os testes de ALT ou g-GT (GGT). O ensaio de ADA também pode ser útil nos diagnósticos de pleurites tuberculoso (3).

Reagentes:

REAGENTE 1 - Conservar entre 2 e 8° C. Sensível a luz. 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM 4-AA, 0,1 U/mL PNP, 0,2 U/mL XOD, 0,6 U/mL Peroxidase, Estabilizados em BSA a 5,0% e 0,01% de azida de sódio como conservante.

REAGENTE 2 - Conservar entre 2 e 8° C. 50mM Tris-HCl pH 4,0, 10 mM Adenosine, 2 mM EHSPT
Obs: O reagente não aberto é estável até a data de vencimento impressa no rótulo do produto, e on board (no compartimento refrigerado do analisador) possuem estabilidade de aproximadamente 30 dias. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e Cuidados Requeridos:

Reagentes contendo material de origem humana. Tratar como potencialmente infectante todos os materiais de origem humana fornecida neste kit foram testados para verificar a presença de HBsAg, anti-HCV, e anti-HIV-1/2 e os resultados encontrados foram negativos para o Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpos para HIV-1/2 e Virus da Hepatite C (requeridos pelo FDA). Porém estes testes não podem garantir a ausência de agentes infectantes.

AVISO - Os reagentes deste ensaio contêm azida sódica como preservativo. A azida sódica (NaN₃) pode reagir com as tubulações de chumbo e cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas. Ao desprezar os reativos, enxaguar com uma grande quantidade de água fria para prevenir a formação destas azidas. Azida de sódio é tóxica quando da ingestão. Se houver ingestão, comunique imediatamente ao diretor do laboratório ou o centro de controle de veneno.

Devem-se seguir exatamente as instruções de uso do kit para obter-se a validação dos resultados, não misture os componentes de outros kits, não usar o kit após o vencimento, não pipete as soluções através da boca.

R1 é sensível a luz, é indicado o armazenamento em local escuro.

Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância entre 540 - 550 nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Calibradores e soros controle.
6. Medidor de tempo.

Amostra:

Soro, plasma (tratado com heparina, não usar citrato ou oxalato), líquido pleural ou líquido. A ADA no soro ou plasma é estável por no máximo 7 dias se mantido entre 2 - 4°C. A amostra poderá ser congelada por 1 mês a (-20°C). Líquido Pleural deve ser colhido em tubo estéril ou heparinizado, processado dentro de 2 horas à temperatura ambiente ou armazenado a 4°C ou -20°C por 2 dias e até 2,5 anos a -80°C. Líquor deve ser claro e coletado em tubo estéril sem anticoagulante, pode ser armazenado por 24h a 25°C, 7 dia a 4°C ou 3 meses a -20°C.

Amostras hemolizadas, lipêmicas ou contaminadas por agentes microbiológicos, podem interferir na exatidão deste teste, e não devem ser usadas.

Todas as amostras são consideradas potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

Preparo do Paciente:

Não é necessário jejum. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

Interferências:

- Ensaio é específico para ADA e não tem nenhuma reação detectável com outro nucleosídeos.

- Ensaio não é afetado pela bilirrubina do soro até 30mg/dL, hemoglobina até 200 mg/dL, triglicérides até 750mg/dL e ácido ascórbico até 4 mg/dL.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C
Comprimento de Onda: 550 nm
Tipo de Reação: Cinética
Direção: Crescente
Relação Amostra/Reativo: 1:52
Vol. Amostra: 20µL
Vol. Reagente 1: 700 uL
Vol. Reagente 2: 350µL
Tempo de Incubação: 5 minutos (retardo)
Intervalo de Leitura: 3 minutos
Número de Intervalo: 1 - 2

Calibração:

Utilizar Calibrador ADA - cód. 7039. A concentração de ADA no calibrador é rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI.

Procedimento Automatizado:

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.

Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual até o item 4 (incubação), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Procedimento Manual:

1. Separar 2 tubos de ensaio e realizar os procedimentos :

Calibrador	Amostra/S.C.	Calibrador
-	20µL	20µL
Amostra/S.C.	20µL	-
Reagente R1	0,7mL	0,7mL
Reagente R2	0,35mL	0,35mL

2. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 3 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.
3. Zerar o espectrofotômetro a 550 nm com água destilada;
4. Colocar 700 µL Reagente 1 e adicionar cuidadosamente 20µL do calibrador no tubo correspondente, homogeneizar e incubar 3 minutos em Banho Maria a 37°C (o nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.);
5. Adicionar 350 µL do Reagente 2 no tubo;
6. Incubar em Banho Maria a 37°C;
7. Registrar a absorbância inicial (A1) quando completar 5 minutos de incubação e a absorbância final (A2) aos 8 minutos de incubação;
8. Determinar a diferença de absorbância/min (Δ Abs./min), subtraindo a leitura final (A2) de sua anterior (A1);
9. Proceder em seguida do mesmo modo com o soro controle e as amostras;

Nota: Realizar a incubação das amostras e soro controle individualmente.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos:

(Abs.=Absorbância) / (Conc. = Concentração)

(Δ Abs. /min = A2 - A1)

ADA Amostra = Δ Abs. /min(amostra) Conc. do

(U/L) X calibrador

Δ Abs. /min(calibrador) (U/L)

Exemplo:

Concentração do calibrador = 49,5 U/L

A1 calibrador = 0,010 / A2 calibrador = 0,060

A1 amostra = 0,008 / A2 amostra = 0,015

Δ Abs./min calibrador = (0,060 - 0,010) = 0,05

Δ Abs./min amostra = (0,015 - 0,008) = 0,007

ADA Amostra = 0,007

(U/L) X 49,5

0,05

ADA Amostra = 6,93 U/L

Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 200 U/L.

Amostras com valores superiores a 200 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 0 - 200 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Portanto, o uso de controles para avaliar a precisão e inexistência das determinações deve ser prática rotineira no laboratório clínico. Aconselhamos o uso dos Soros Controle ADA (Nível I e Nível II) Cód. 7040.

Valores Esperados:

Soro ou Plasma: 0 - 15 U/L

Líquido Pleural: 0 - 30 U/L

Líquor (LCR): 0 - 9 U/L

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Estudos Comparativos:

Os valores dos testes das amostras de plasma e soro dos pacientes foram comparadas com ProMedX em um gráfico e obtido o valor de: y = 1.0688x - 0,4219 r² = 0,9894

Precisão:

A precisão do teste da Deaminase de Adenosina (ADA) foi avaliada no analisador Cobas Mira de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocolo EP-5. No estudo, duas amostras contendo 11.0 + 2.75 e 30.0 + 5.4 U/L de Deaminase de Adenosina foram testadas 2 vezes por dia em duplicatas por 15 dias.

* Precisão do Teste

Número de dosagens	Controle Normal	Controle Anormal
	Adenosina Deaminase	Adenosina Deaminase
Média (U/L)	11.11	30.74
SD (U/L)	0.16	0.45
CV%	1.47	1.45

* Precisão Intra-Laboratorial

Número de dosagens	Controle Normal	Controle Anormal
	Adenosina Deaminase	Adenosina Deaminase
Média (U/L)	30	30
SD (U/L)	9.63	29.62
CV%	0.47	0.59
	4.90	2.00

Exatidão:

Determinada correndo 3 amostras em triplicata de Deaminase de Adenosina em 3 diferentes lotes de reagente.

Lote Reagente nº	Pool I	Pool II	Pool III
AD01304	52.0	54.8	205.04
AD01504	50.5	54.5	204.7
AD01604	50.08	52.2	196.58
Média (U/L)	50.86	53.83	201.90
S.D.	1.01	1.42	4.63
% CV	2.0	2.63	2.3

Sensibilidade Metodológica:

0,033 U/L

Especificidade:

Nos estudos comparativos realizados apresentamos dados determinados em um analisador. A comparação com soros controles já validados mostrou uma especificidade analítica adequada.

Observações:

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ³1 mega ohm ou condutividade £ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxague da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ³0,1 megaohms ou condutividade £ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Bioquímica Geral: R1= 5 x 10mL + R2= 5 x 5mL

Linha Hitachi 917: R1= 1 x 60mL + R2= 1 x 30mL

Linha Quimistat 450: R1= 3 x 20mL + R2= 2 x 20mL

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com e www.ebram.com

Referência Bibliográfica:

- 1) Kobayashi F, Ikeda T, Marumo F, Sato C: Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. Am. J. Gastroenterol. 88: 266-271 (1993)
- 2) Kallkan A., Bult V., Erel O., Avci S., and Bingol N. K. : Adenosine deaminase and guanosine deaminase activities in sera of patients with viral hepatitis. Mem Inst. Oswaldo Cruz 94(3) 383-386 (1999)
- 3) Burgess LJ, Maritz FJ, Le Roux I, et al. Use of adenosine deaminase as a diagnostic tool for tuberculous pleurisy. Thorax 50: 672-674 (1995)



APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

GENERAL	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S-SR1
Calibration Mode:	SLOPE AVG
Reagent Blank:	Reagent/DIL
Cleaner:	No
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	2
Unit:	U/L
ANALYSIS	
Dilution Name:	STD
Factor:	Main STD
Time:	Sample Dil Name
Post Dil Factor:	4.00
Sample:	Circle: 1
Volume:	4.0 uL Dil: 0.0 uL
Reagent:	Circle: 1
Volume:	130 uL
Start Reagent 1:	Circle: 7
Volume:	65 uL Dil: 0.0 uL
Start Reagent 2:	Circle: 7
Volume:	Dil:
CALCULATION	
Sample Limit:	No
Point:	
Reaction Direction:	Increase
Check:	
Conversion Factor:	1.0000
Offset:	0.0000
Test Range Low:	0.000 U/L
High:	200.00 U/L
Norm Range Low:	0
High:	15
Number of Steps:	1
Calculation Step A:	Kinética
Readings First:	19
Last:	27
Reaction Limit:	
Point:	
Calib Interval:	
CALIBRATION	
Reagent Blank:	ON REQUEST
Reagent Range:	No
Reagent Range Low:	-0.1
High:	0.3
Blank Range Low:	-0.1
High:	0.1
Factor:	
Calibrator Pos:	*
STD1:	**
STD2:	STD2: No
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc Model:	
Correction STD:	
Replicate:	Duplicate
Deviation:	5%
CONTROL	
CS1 - Pos (*) Assion (***) Low (***) High (***)	
CS2 - Pos (*) Assion (***) Low (***) High (***)	
CS3 -	

(*) colocar a posição correspondente do Rack CAL/CS
 (**) colocar o valor correspondente do calibrador
 (***) colocar o valor correspondente do controle

APLICAÇÃO PARA EXPRESS 550

Test Name: ADA	Test: ADA			
Test Bar Code: ADA				
Test Type: Kinetic	Curve Type: Blanked Linear			
Units: U/L	Nº of Decimal Places: 1			
Primary Wavelength: 540	Secondary Wavelength:			
Read Time Interval: 180	Sample Blank: NO			
Factor:				
Calibration Interval: (*)				
Normalization Interval: (*)				
Nº of Calibrators: 2	Nº of Replicates: 2			
Low Blank A Limit: -0.200	High Blank A Limit: 0.600			
Low A Limit: -0.200	High A Limit: 2.000			
Low Normal: 0.0	High Normal: 15.0			
Linearity Limit: 200	Curve S.D Limit: 10.0			
Test Name: ADA	Test: ADA			
Test Bar Code: ADA				
Sample Volume: 5 uL	Sample Diluent:			
Reagent Dilution Ratio: 1	Predilution Ratio: 1			
Reagent Dilution:				
	Reagent Volume			
	Bar Code			
	Diluent Volume			
	Lag Time			
Reagent 1	180	ADA1		180 sec
Reagent 2	90	ADA2		300 sec
Reagent 3				
Reagent 4				
Controls:				(*)

(*) introduzido pelo operador

Ebram Prods.Laboratoriais Ltda.
 Rua Júlio de Castilhos, nº 500 - Belenzinho
 São Paulo - SP - Cep: 03059-001
 Tel.: (11) 2291-2811
 Indústria Brasileira
 CNPJ: 50.657.402/0001-31
 www.ebram.com
 sac@ebram.com
 SAC: (11) 2291-2811
 Resp.Téc.: Nadjara Novaes Longen
 CRF-SP - 37.451

Nº do Reg. MS: 10159820145
 Edição: ago/2015

APLICAÇÃO PARA SELECTRA

Name:	ADA
Abb Name:	ADA
Mode:	TwoPoint
Wavelength:	548nm
Units:	U/L
Decimals:	1
Low Conc:	0 U/L
High Conc:	200 U/L
Calibrator Name:	(*)
Repeat:	2
Number:	1
Concentration:	(**)
Interval:	(*)
Cut off:	NO
Prozone Check:	NO
Ref Male Low:	0.0
Ref Male High:	15.0
Ref Female Low:	0.0
Ref Female High:	15.0
Ref Pad Low:	0.0
Ref Pad High:	15.0
Control 1:	(***)
Control 2:	(***)
Control 3:	(***)
Correlat Factor:	1.000
Correlat Offset:	0.000 U/L
DUAL MODE	
Name:	ADA
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 mL
Normal Volume:	180 uL
Rerun Volume:	182 uL
SAMPLE	
Normal Volume:	5 uL
Rerun Volume:	3 uL
R2 Bottle:	5 mL
Normal Volume:	90 uL
Rerun Volume:	90 uL
Predilution:	NO
Slope Blank:	NO
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Point One, Two:	236.416
Incubation Time:	
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	0.500
Substr Depletion:	3.000 ABS
Reagent Blank:	YES (#)
R ABS Deviation:	
Cal Low Limit:	(*)
Cal High Limit:	(*)
Factor:	#
MONO MODE	
Name:	ADA
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 mL
Normal Volume:	250 uL
Rerun Volume:	252 uL
SAMPLE	
Normal Volume:	5 uL
Rerun Volume:	3 uL
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Predilution:	
Incubation Time:	236.416
Point One, Two:	
Low Absorbance:	-0.100 abs
High Absorbance:	3.000 abs
R ABS L Limit:	-0.100 abs
R ABS H Limit:	3.000 abs
Substr Depletion:	
R ABS Deviation:	3.000 abs
Reagent Blank:	YES #
Cal Low Limit:	(*)
Cal High Limit:	(*)
Factor:	#

(*) Introduzido pelo operador
 (**) Colocar a concentração do calibrador
 (***) Colocar a concentração do controle
 (#) Calculado pelo equipamento

APLICAÇÃO PARA BTR 810

Name:	ADA
Point Final:	UR
Units:	microematica
Mode Label:	546
Filter:	
Tempo Estab:	
Factor:	
Tempo de Incubação:	30
Tempo de Intervalo:	180
Nº de Intervalos:	1
Temperatura:	37°C
Volume Aspirado:	500
Tipo Reação:	enzimática
Estandart:	(*)

APLICAÇÃO PARA QUICK LAB

Mode:	CINETICA
Label:	Microsom
Filter:	546
Temperature:	37°C
Volume Asac:	500
Units:	UR
Incubation:	200
CS Code:	Comando
Padão:	Padão
Factor:	(*)
Delay Interval:	30
Quant Interval:	1
Tempo Interval:	180
Tempo Estab:	

APLICAÇÃO PARA BIO 2000

Mode:	TF
WL1:	546
Blank:	NÃO
Blk Area Pad:	
Temp:	37°C
Vol Asac:	0400
Rel:	005
Pat:	
Padão:	SIM
Pat1:	(*)
Unit:	UR
Dev:	1
Int Clin:	180
nº Int:	
dADMIN:	
%Lim Lin:	
Dir:	INCR
Lim Lin - Min/Max:	0000 / 2000
Abs Real - Min/Max:	
Abs Pad - Min/Max:	0.000 / 1.000
Vol/N - Min/Max:	0000 / 0015

APLICAÇÃO PARA RA-XT

Name:	
Immunoassay:	
Chemistry Type:	
Bio Inve:	
Immune Chemistry:	
% Sample Volume:	
Wavelength:	
Bichromatic Chemistry:	
Bichromatic Factor:	
K1:	
K2:	
Bio Limit 1:	
Bio Limit 2:	
Deletion Limit:	
Delay Time:	
Blank Type:	
Incubate:	
% Reagent Volume:	
2nd Reagent:	
2nd Reagent Volume:	
A2 Delay:	
Units:	
Unit Factor:	
Decimal Point:	
RBL Low:	
RBL High:	
Range Low:	
Range High:	
Calibration Factor:	
Reagent Rate:	
Standard Value:	
Normal Low:	
Normal High:	
Slope:	
Intersect:	
C1:10:E6:	
C2:10:E6:	
D1:10:E6:	
Delta #:	
Linear Factor:	
Final Limit:	
Endpoint Limit:	

(*)

APLICAÇÃO PARA AIRONE

Measure Unit:	Decimals:	Reaction Type:
Volume (u):	Reagent 1:	Reagent 2:
Abs Range (m Abs):	Min:	Max:
Linearity Limit:		Reagent Blanking:
Contaminating:		Differential:
Filter 1:		Filter 2:
Time (sec):	Mix 1:	Incubation 1:
	Mix 2:	Incubation 2:
Measurement Type:		Factor:
Normal Range:		
Age (yrs):	Homens	Mulheres
Below 10:	Min. Max.	Min. Max.
From 10 to 60:		
Over:		

Disponemos de programações para outros analisadores, entre em contato com SAC EBRAM.