



QUIMIADA - Adenosina Deaminase

Desaminação Enzimática

REG. MS: 10159820145

EBRAM PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA.

Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho

São Paulo - SP - Tel.: +55 11 2291 2811

CEP 03059-001 | Indústria Brasileira

CNPJ.: 50.657.402/0001-31

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Dra. Nadjara Novaes Longen | CRF-SP - 37.451

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**

0800 500 2424 ou ☎ 11 2574 7110

sac@ebram.com | www.ebram.com

Revisão Maio/2022

FINALIDADE. Reação cinética para determinação quantitativa da atividade da Deaminase de Adenosina (ADA) em amostras de soro, plasma, líquido pleural e líquor 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 o 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 presentes nos reagentes deste 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 Vírus 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.

RI 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. Cronômetro

AMOSTRA. Soro, plasma (tratado com heparina, não usar citrato ou oxalato), líquido pleural ou líquor. 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	550nm
Tipo de Reação	Cinético
Direção	Crescente
Relação Amostra/Reativo	1:52
Vol. Amostra	20 µL
Vol. R1	700 µL
Vol. R2	350 µL
Tempo de Incubação	5 minutos (retardo)
Intervalo de leitura	3 minutos
Número de intervalos	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:

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

- 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. Zerar o espectrofotômetro a 550 nm com água destilada;
- 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.);
- Adicionar 350 µL do Reagente 2 no tubo;
- Incubar em Banho Maria a 37°C;
- Registrar a absorbância inicial (A1) quando completar 5 minutos de incubação e a absorbância final (A2) aos 8 minutos de incubação;
- Determinar a diferença de absorbância/min (Δ Abs./min), subtraindo a leitura final (A2) de sua anterior (A1);
- 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)

$$\text{ADA Amostra (U/L)} = \frac{\Delta \text{ Abs. /min (amostra)}}{\Delta \text{ Abs. /min (calibrador) (U/L)}} \times \text{Conc. do calibrador}$$

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

$$\text{ADA AMOSTRA (U/L)} = \frac{0,007}{0,05} \times 49,5 = 6,93 \text{ U/L}$$

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 imprecisão e inexatidão 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 ProMedDx em um gráfico e obtido o valor de: $y = 1.0688x - 0,4219$ $r^2 = 0,9894$

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

	Controle Normal Adenosina Deaminase	Controle Anormal Adenosina Deaminase
Número de dosagens	30	30
Média (U/L)	11,11	30,74
SD (U/L)	0,16	0,45
C.V. (%)	1,47	1,45

* Precisão do Teste

	Controle Normal Adenosina Deaminase	Controle Anormal Adenosina Deaminase
Número de dosagens	30	30
Média (U/L)	9,63	29,62
SD (U/L)	0,47	0,59
C.V. (%)	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
AD01504	52,0	54,8	205,04
D.P. (mg/dL)	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
C.V. (%)	2,0	2,63	2,3

SENSIBILIDADE METODOLÓGICA. O 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.

- A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 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 $\geq 0,1$ 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 Quimicat 450: R1= 3 x 20mL + R2= 2 x 20mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Kobayashi F, Ikeda T, Marumo F, Sato C: Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. Am. J. Gastroenterol. 88 266-271 (1993)
- Kalkan 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)
- 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)

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		REAGENTE		FABRICADO POR
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)		NÚMERO DO LOTE
	LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)		PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		NÚMERO DO CATÁLOGO