

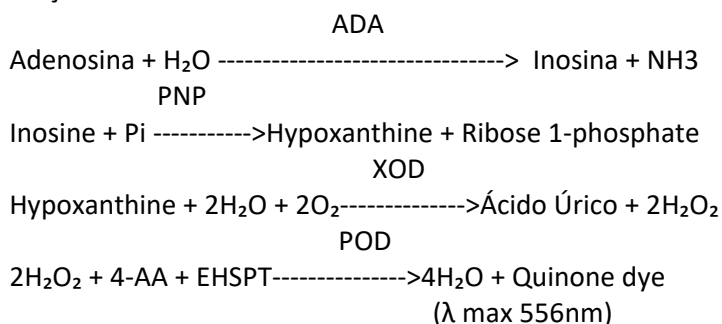
Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIADA – ADENOSINA DEAMINASE	Página 1 de 4 POPPIOxxx/xx
--------------------------------------	---	---------------------------------------

USO

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 a 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.

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 alcoólico, 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).

PRODUTO UTILIZADO

Quimiada – Adenosina Deaminase MS: 10159820145

Fabricante: Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.

Rua Julio de Castilhos, 500.

Belenzinho – São Paulo – SP – Brasil – CEP: 03059-001

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM:

Tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com e www.ebram.com

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.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIADA – ADENOSINA DEAMINASE	Página 1 de 4 POP BIOxxx/xx
--------------------------------------	---	--

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

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 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.

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

AMOSTRA

Soro, plasma (tratado com heparina, não usar citrato ou oxalato), líquido pleural ou liquor. 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 a temperatura ambiente ou armazenado a 4°C ou -20°C por 2 dias e até 2,5 anos a -80°C.

Liquor deve ser claro e coletado em tubo estéril sem anticoagulante, pode ser armazenado por 24h a 25°C, 7 dias 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.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância entre 540 - 550nm.
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.

PROCEDIMENTO

• Procedimento automático:

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

Aplicação no sistema semiautomático: 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 conforme abaixo:

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

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.

Reagente R2	0,35mL	0,35mL
-------------	--------	--------

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 amostras menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS

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

(Δ Abs. /min = A2 - A1)

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

RESULTADOS

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.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- **Linearidade / Sensibilidade**

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

Amostras com valor superior a 200 U/L devem ser diluídas com NaCl a ponto de ficarem entre 0 -200 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Sensibilidade : 0.0 U/L

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIADA – ADENOSINA DEAMINASE	Página 1 de 4 POP BIOxxx/xx
--------------------------------------	---	--

- **Interferências:** - Ensaio é específico para ADA e não tem nenhuma reação detectável com outro nucleosídeo.
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.

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 ≥ 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 $\geq 0,1$ mega ohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxague final utilizar água tipo II.

REFERÊNCIAS

1. Kobayashi F, Ikeda T, Marumo F, Sato C: Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. Am. J. Gastroenterol. 88: 266-271 (1993)
2. 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)
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)
4. Arquivos da EBRAM

	Nome	Assinatura	Data
Elaborado por			
Aprovado por			
Revisado por			
Desativado por			
Razão			