

Adenosina Deaminasa

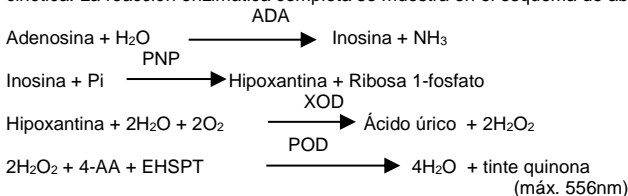
Colorimétrico - Cinético

Determinación cuantitativa de Adenosina Deaminasa (ADA) en muestras humanas de suero IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba de ADA se basa en la desaminación enzimática de adenosina a inosina que se convierte en hipoxantina por purina nucleósido fosforilasa (PNP). A continuación la hipoxantina se convierte en ácido úrico e hidrógeno peróxido (H₂O₂) por xantina oxidasa (XOD). H₂O₂ se reactiva con N-Etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (EHSPT) y 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa (POD) para generar tinte quinona que se monitoriza de forma cinética. La reacción enzimática completa se muestra en el esquema de abajo.



Una unidad de ADA se define como la cantidad de ADA que genera un μmol de inosina a partir de adenosina por min. a 37°C.

SIGNIFICADO CLÍNICO

ADA es un enzima catalizador de la reacción de desaminación a partir de adenosina a inosina. La enzima se distribuye ampliamente en los tejidos humanos, especialmente en tejidos con alto contenido en linfocitos. Se observan niveles elevados en pacientes con hepatitis aguda, fibrosis hepática alcohólica, hepatitis activa crónica, cirrosis, hepatitis viral y hepatoma^{1,2}. Se observa también un aumento de la actividad del ADA en pacientes con efusiones de tuberculosis³. La determinación de la actividad del ADA en el suero de pacientes puede añadir valores únicos en el diagnóstico de cirrosis en combinación con pruebas ALT o γ-GT (GGT). La prueba ADA puede también ser útil en el diagnóstico de pleuritis tuberculosa³.

REACTIVOS

R 1	Tris-HCl pH 8,0	50 mM
	4-AA	2 mM
	PNP	0,1 U/mL
	XOD	0,2 U/mL
	Peroxidasa	0,6 U/mL
R 2	Tris-HCl pH 4,0	50mM
	Adenosina	10 mM
	EHSPT	2 mM
ADA CAL	Ref. 1002230	

PREPARACIÓN

Los reactivos están listos para su uso. El Calibrador y Control de ADA son liofilizados, y antes de ser usados necesitan reconstituirse con 1,0 mL de agua destilada.

PRECAUCIONES

R1 es sensible a la luz y se debe conservar en lugar oscuro. Los reactivos contienen < 0,1% Azida Sódica. Evitar la ingestión o el contacto con la piel o membranas mucosas. En caso de contacto con la piel, limpiar la zona afectada con abundante agua. En caso de contacto con los ojos o ingestión, acudir inmediatamente al médico. Todos los especímenes utilizados en esta prueba se deben considerar como potencialmente infecciosos.

CALIBRACIÓN

Se recomienda que la prueba se calibre utilizando el Calibrador ADA ref.1002230 incluido en el kit.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación durante el uso. No utilice reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o colorímetro para mediciones a 540/550nm.
- Baño termostático a 37°C (± 0.1°C)
- Cubetas de paso de luz de 1,0 cm.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

El ensayo se puede realizar con suero, plasma heparinizado, líquido pleural, o líquido cerebroespinal (LCR). Lo ideal sería extraer sangre venosa y manipularla de forma anaeróbica. No utilizar citrato ni oxalato como anticoagulante. El plasma y el suero, tras la rápida separación de las células o coágulos, se deben cerrar herméticamente con un tapón. El contenido de ADA de la sangre permanece estable durante una semana cuando se almacena a 2-8°C. El líquido pleural se debe recoger en un tubo estéril o heparinizado y procesado dentro de las siguientes 2 h a temperatura ambiente, o conservarlo a 2-8°C o -20°C durante 2 días y hasta 2,5 años conservado a -80°C.^{7,8,9}

El fluido cerebroespinal (LCR) debe ser claro y recogido en un tubo estéril sin anticoagulante. El reactivo de ADA en LCR es estable durante 24 h a 25°C, 7 días a 2-8°C y 3 meses a -20°C.¹⁰

PROCEDIMIENTO

- Condiciones de la prueba:
Longitud de onda (principal/sub): 550 nm
Cubeta: paso de luz de 1 cm
Temperatura constante 37°C
- Mezclar 5 μL de muestra con 180 μL R1 e incubar a 37°C durante 3 minutos.
- Añadir 90 μL R2 en la cubeta, mezclar y esperar durante 5 minutos.
- Leer la absorbancia inicial y encender el cronómetro simultáneamente, leer otra vez después de 3 minutos.
- Calcular el cambio de absorbancia por minuto (ΔA/min)

CÁLCULOS

$$\text{ADA (U/L)} = \frac{\Delta A_{\text{muestra}} / \text{min}}{\Delta A_{\text{calibrador}} / \text{min}} \times \text{valor calibrador}$$

Unidades: Una unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras control valorados: Control ADA ref. 1002232 (2 niveles).

Si los valores de control están fuera del rango definido, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio deberá disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Suero: 0 -15 U/L¹⁻⁴; Líquido pleural: 0-30 U/L; LCR: 0-9 U/L^{4,6}

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Linealidad: La prueba es lineal hasta la concentración de ADA de 200 U/L.

Si los resultados obtenidos fuesen mayores que el límite de linealidad, diluir 1/2 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado por 2.

Precisión: Se estudian 2 muestras de suero de 11 U/L y 30 U/L con 2 lecturas por día con duplicados durante 15 días laborales:

	Within Run (N=30)		Run to Run (N=30)	
	11 U/L	30 U/L	11 U/L	30 U/L
Mean (U/L)	11,11	30,74	9,63	29,62
SD	0,16	0,45	0,47	0,59
CV (%)	1,47	1,45	4,90	2,00

Sensibilidad: La concentración mínima detectable de ADA con un nivel aceptable de precisión es 0 U/L.

Las características del método varían según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con Bilirrubina (hasta 30 mg/dL), Hemoglobina (hasta 200 mg/dL), Triglicéridos (hasta 750 mg/dL) y Ácido Ascórbico (hasta 4 mg/dL).

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Kobayashi F, Ikeda T, Marumo F, Sato C: Adenosine desaminase 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)
- Boonyagars L., Kiertiburanakul S.: Use of Adenosine Deaminase for the Diagnosis of Tuberculosis: A Review. *J. Infect. Dis Antimicrob Agents* 2010; 27:111-8
- Delacour H., Sauvanet C., Ceppa F., Burnat P.: Analytical perfor-mances of the Diazyme ADA assay on the Cobas 6000 system. *Clini-cal Biochemistry* 43 (2010) 1468-1471.
- Feres MC, De Martino MC, Maldijian S, et al.: Laboratorial valida-tion of an automated assay for the determination of adenosine deami-nase activity in pleural fluid and cerebrospinal fluid. *J Bras Pneumol.* 2008; 34(12): 1033-1039.
- Porcel JM.: Handling Pleural Fluid Samples for Routine Analyses. *Derleme.* June 2013; 19-22.
- Al-Shammery F.J.: Adenosine Deaminase Activity in Serum and Pleural Effusions of Tuberculous and Non-Tuberculous Patients. *Bi-ochemistry and Molecular Biology International* 43(4) 763-779 (1997)
- Bielsa S., Esquerda A., Palma RM, et al.: Influence of Storage Time on Pleural Fluid Adenosine Deaminase Activity. *Clin.Lab.* 2014; 60: 501-504.
- Gupta BK, Parul G, Haren B, et al.: Cerebrospinal fluid Adenosine deaminase: its evaluation as a marker for diagnosing tu-berculous meningitis in paediatric patients. *IOSR-JDMS* Jan.-Feb. 2013; 4(1): 21-24.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001070	Cont.	R1: 1 x 40 mL
		R2: 1 x 20 mL
		CAL: 1 x 1 mL

