

ADA (Adenosine Deaminase)

IVD

,DETERMINAZIONE UV METODO CINETICO QUANTITATIVO dell'ADENOSINA DEAMINASI (ADA) su SIERO, LIQUIDO PLEURICO e CSF (Liquido cerebrospinale) con Analizzatore MINDRAY BS-300. Tracciabile all'ERM (BCR - 647) **REF NCADA016**

500 tests (5 x 20 mL)

DESTINAZIONE D'USO

L'adenosina deaminasi (ADA) è uno degli enzimi chiave del metabolismo purinico. E' necessaria per la rottura della adenosina dal cibo e per la rotazione degli acidi nucleici nei tessuti. Presente virtualmente in tutte le cellule dei mammiferi, la sua funzione primaria negli umani è lo sviluppo ed il mantenimento del sistema immunitario. Tuttavia, il completo ruolo fisiologico non è ancora completamente conosciuto. L'enzima è stato ritrovato nei batteri, piante, invertebrati, vertebrati e mammiferi, con una elevata conservazione della sequenza aminoacidica. L'alto grado di conservazione suggerisce la cruciale natura di ADA nella via di recupero delle purine.

Tuttavia, l'associazione con ADA è stata osservata con la differenziazione delle cellule epiteliali, nella neurotrasmissione e nel mantenimento della gestazione; un aumento dell'attività di ADA nel fluido pleurale è utile nella valutazione della effusione pleurale tubercolotica. Alcune mutazioni nel gene della adenosina deaminasi causano la sua non espressione. La risultante carenza è una causa della letale immunodeficienza combinata severa (SCID). Livelli carenti di ADA aumentano il deposito di deossadenosina, che rapidamente diventa dATP, un inibitore molto tossico della proliferazione dei leucociti, uccidendo la sintesi del DNA; livelli carenti di ADA sono anche stati collegati con l'infiammazione polmonare, la morte delle cellule timiche e la segnalazione difettosa del recettore delle cellule T.

Livelli elevati di ADA sono stati anche associati con l'AIDS.

PRINCIPIO

La Adenosina Deaminase (ADA) catalizza l'idrolisi del substrato Adenosina. L'Ammoniaca ottenuta da questa reazione reagisce con α -chetoglutarato e NADPH per mezzo della Glutamato deidrogenasi (GIDH) dando NADP.

La diminuzione dell'assorbanza di NADPH, per ossidazione a NADP, è proporzionale all'attività di ADA nel campione.

Usando il Calibratore contenuto nel kit, tracciabile allo Standard Internazionale BCR - 647, è possibile preparare una curva di calibrazione a cui fare riferimento. Riportando sulla medesima i valori di assorbanza e le concentrazioni dei singoli punti, si possono determinare le concentrazioni dei singoli campioni.

PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di ADA maggiori di 150 U/L, diluire il campione 1:4 con fisiologica, ritestare e moltiplicare il risultato x4.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti).

Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le

ucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

ATTENZIONE!

A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.

B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli di ADA (cfr Bibliografia 2).

C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.

E) Utilizzare campioni freschi, se disponibili.

F) **NON USARE** campioni emolizzati, perché le cellule del sangue hanno una alta concentrazione di ADA.

G) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.

H) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

I) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.

Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

REAGENTI

Composizione del kit:

R1 - BUFFER

Good Buffer >20 mmol/L

R2 - GIDH

Adenosina >0.1 g/L

GLDH >1000 U/L

NADPH >0.25 mmol/L

α -chetoglutarato >0,1 mmol/L

Eccipienti e stabilizzanti

R3 - CAL

Siero umano stabilizzato

NaN₃ < 0.1%

STABILITÀ: i Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 2-8°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ

REF NCADA016

5 x 20 mL

5 x 20 mL

1 x 1 mL



ADA (Adenosine Deaminase)

IVD

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):

- ADA CALIBRATOR for CSF Iyo

- ADA CONTROL Iyo

- ADA CONTROL for CSF Iyo

REF NCADACSF

REF NCADACO1

REF NCADACO2

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Dissolvere un vial di **R2 - GIDH** con 20 mL di **R1 - BUFFER** (cioè l'intero flacone). Mescolare gentilmente e portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione. L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.

STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO

Il REAGENTE DI LAVORO è stabile 3 giorni a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEL CALIBRATORE

Dissolvere un vial di **R3 - CAL** con 1 mL di acqua distillata; non utilizzare soluzioni saline o PBS, ma solo acqua distillata! Mescolare gentilmente fino a completa soluzione, evitando la schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.

CAUTELA

Il Calibratore è di origine umana e deve essere maneggiato come una potenziale via di infezione. Questo prodotto è stato testato con reagenti rilasciati per la determinazione degli anticorpi di HIV, HCV e HBsAg: i risultati sono stati negativi, di nessuna reattività.

Tuttavia, nessun metodo conosciuto può offrire una completa assicurazione che i prodotti provenienti da esseri umani non trasferiscano agenti infettivi; pertanto raccomandiamo espressamente che questi prodotti, come tutti i campioni, vengano maneggiati con le medesime precauzioni, come potenziali trasmettitori di patologie infettive.

STABILITÀ DEL CALIBRATORE

Il calibratore è stabile:

- 5 giorni se conservato a 2-8°C;

- fino a 3 mesi se conservato a -20°C, aliquotato in piccoli volumi.

CONGELARE solo UNA VOLTA. NON RIPETERE IL CONGELAMENTO.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Normale attrezzatura da laboratorio.

Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 µL.

Puntali monouso per micropipette.

Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.

Soluzione fisiologica, acqua distillata, Calibratori e Controlli.

Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

CAMPIONI

• Siero fresco non emolizzato e non lipemico.

• Liquido pleurico fresco non emolizzato.

• Liquido cerebrospinale (CSF) fresco, non emolizzato.

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS)

(cfr Bibliografia 3).

SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

PROCEDURA ANALITICA su

SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: cinetico
- Reazione: 3 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/20

Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare in una provetta o in una cuvetta così etichettata:

S: campione, ST: calibratore:

	S	ST
REAGENTE DI LAVORO	1000 µL	1000 µL
Campione	50 µL	----
Calibratore	----	50 µL

Mescolare gentilmente ed incubare a 37°C per 4 minuti.

Leggere l'assorbanza iniziale a 340 nm dello standard (Ast) e del campione (As).

Ripetere la lettura esattamente dopo 1, 2 e 3 minuti.

Calcolare la media delle letture di assorbanza/minuto dello standard ($\Delta Ast/min$) e del campione ($\Delta As/min$).

ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 4, 5, 6)

Valori normali ADA: 6.8 – 18.2 U/L.

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

CALCOLO

Inserire le medie trovate nella seguente formula:

Adenosina Deaminasi (U/L 37°C) =

$$\text{valore dello Standard} \times \frac{\Delta As/\text{min Campione}}{\Delta Ast/\text{min Standard}}$$

PROCEDURA ANALITICA CON CSF (Liquido cerebrospinale) su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

PREPARAZIONE DEI REAGENTI DI LAVORO.

I reagenti sono i medesimi del kit, ad eccezione del Calibratore e del Controllo. Per calibrare con CFS si consiglia l'utilizzo di un particolare calibratore ADA per CSF a basse concentrazioni (REF NCADACSF). Per garantire l'adeguata prestazione del test, si suggerisce di utilizzare il kit ADA Controllo per CSF (REF NCADACO2) (vedere il relativo inserto).

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)



ADA (Adenosine Deaminase)

- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: cinetico
- Reazione: 5 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/4

Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare in una provetta o in una cuvetta così etichettata:

S: campione, ST: calibratore:

	S	ST
REAGENTE DI LAVORO	1000 µL	1000 µL
Campione	250 µL	----
Calibratore	----	250 µL

Mescolare gentilmente ed incubare a 37°C per 4 minuti.

Leggere l'assorbanza iniziale a 340 nm dello standard (Ast1) e del campione (As1).

Ripetere la lettura esattamente dopo 5 minuti dello standard (Ast2) e del campione (As2).

Calcolare la differenza delle letture di assorbanza/5 minuti di

$$\text{Standard } \Delta\text{Ast}/5\text{min} = \text{Ast1} - \text{Ast2} \quad \text{e}$$

$$\text{Campione } \Delta\text{As}/5\text{min} = \text{As1} - \text{As2}$$

ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

VALORI DI RIFERIMENTO

Non sono disponibili in letteratura valori di riferimento per CSF.

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

CALCOLO

Inserire le medie trovate nella seguente formula:

$$\text{Adenosina Deaminasi (U/L } 37^\circ\text{C)} = \frac{\Delta\text{As}/5\text{min Campione}}{\text{valore dello Standard ADACFS} \times \frac{\Delta\text{As}/5\text{min Standard}}{\text{valore dello Standard ADACFS}}}$$

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE PER CSF

1. Per eseguire la calibrazione in automazione si suggerisce di utilizzare il seguente schema:

CAL1 --- acqua distillata (conc. 0.0)

CAL2 --- Calibratore per CSF (concentrazione riportata nell'inserito ADACFS)

2. Si suggerisce di non diluire ulteriormente il Calibratore per CSF. Se strettamente necessario, diluire il Calibratore per CSF SOLO con acqua distillata.

UTILIZZARE IMMEDIATAMENTE: stabilità a 2-8°C per non più di una ora e mezza.

PRESTAZIONI ANALITICHE

(validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente ADA (Adenosine Deaminase) sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati,

pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

Limitazioni del metodo: non sono conosciute limitazioni.

Linearità del metodo: il test è lineare fino a 150 U/L.

Tuttavia, per concentrazioni di ADA maggiori del valore massimo del calibratore, si raccomanda di diluire il campione 1:4 con fisiologica, ritestare e moltiplicare il risultato x 4.

Sensibilità del metodo (LoD): il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 1.9 U/L.

Interferenze: cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero $\pm 10\%$ del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 40 mg/dL;

- emoglobina fino a 300 mg/dL;

- acido ascorbico fino a 50 mg/dL.

Precisione nella serie: determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	42.4 \pm 1.8	2.2
Umano 2	8.5 \pm 1.4	8.5

Precisione tra le serie: determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	42.9 \pm 2.1	2.5
Umano 2	8.9 \pm 1.2	6.6

Accuratezza: un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio. Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare $y = 1.0013x + 0.163$

Coefficiente di correlazione $r = 0.9993 \quad n = 20$

BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Lab. Tests.
4. Martinek R.C., Clin. Chem. 9, 620 (1963).
5. Delia S. et al., Clin. Chem. 33, 1675 (1987).
6. Internal study Maruho Co cod. 5502543.

Codice Ramo CND W01010199



ADA (Adenosine Deaminase)

IVD

ADENOSINE DEAMINASE QUANTITATIVE UV ASSAY KINETIC METHOD on SERUM, PLEURIC LIQUID and CSF (Cerebrospinal fluid) with MINDRAY BS-300 Analyzer. Traceable to ERM (BCR - 647)



500 tests (5 x 20 mL)

REF NCADA016

INTENDED USE

Adenosine deaminase (ADA) is one of the key enzyme of purine metabolism. It is needed for the breakdown of adenosine from food and for the turnover of nucleic acids in tissues.

Present in virtually all mammalian cells, its primary function in humans is the development and maintenance of the immune system. However, the full physiological role of ADA is not yet completely understood.

The enzyme has been found in bacteria, plants, invertebrates, vertebrates, and mammals, with high conservation of amino acid sequence. The high degree of amino acid sequence conservation suggests the crucial nature of ADA in the purine salvage pathway. However, ADA association has also been observed with epithelial cell differentiation, neurotransmission and gestation maintenance; an increase of ADA activity in pleural fluid is useful in the assessment of tuberculous pleural effusion.

Some mutations in the gene for adenosine deaminase cause it to be not expressed. The resulting deficiency is one cause of lethal severe combined immunodeficiency (SCID).

Deficient levels of ADA improve deoxyadenosine storage, which become shortly dATP, a very toxic inhibitor of the proliferation of leukocytes, killing DNA synthesis; deficient levels of ADA has also been associated with pulmonary inflammation, thymic cell death and defective T-cell receptor signalling.

Elevated levels of ADA has also been associated with AIDS.

PRINCIPLE

The Adenosine Deaminase (ADA) catalyzes the hydrolysis of the substrate Adenosine; the Ammonia obtained from this reaction, reacts with α -ketoglutarate and NADPH by means of Glutamate dehydrogenase (GIDH) giving NADP.

The decrease of absorbance of NADPH, for oxidation to NADP, is proportional to the activity of the ADA in the sample.

Using the standard contained in the kit, traceable to the BCR - 647 International Standard, it is possible to prepare a Calibration Curve to refer.

Plotting on the Calibration Curve absorbance values and concentration for each single sample, may be determined the concentration of each sample.

PRECAUTIONS FOR USE

1. This product has been formulated for in vitro diagnostic use.
2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.
3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.
4. For concentration of ADA higher than 150 U/L, dilute the sample 1:4 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 4.
5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents).

However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed

the operating procedures for the manipulation of this product.

Material safety data sheet should be supplied on request.

ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of ADA (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) Use sample fresh, as soon as available.

F) **DO NOT USE** haemolyzed samples, because blood cells have very high concentration of ADA.

G) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

H) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

I) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

REAGENTS

Components of the kit:

R1 - BUFFER		REF NCADA016
Good Buffer	>20 mmol/L	5 x 20 mL
R2 - GIDH		5 x 20 mL
Adenosine	>0.1 g/L	
GIDH	>1000 U/L	
NADPH	>0.25 mmol/L	
ketoglutarate	>0,1 mmol/L	
Excipients and stabilizers		
R3 - CAL		1 x 1 mL
Human stabilized serum		
Na ₃ N < 0.1%		

STABILITY: the Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8 °C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.

In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.



ADA (Adenosine Deaminase)

IVD

AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- ADA CALIBRATOR for CSF Iyo
- ADA CONTROL Iyo
- ADA CONTROL for CSF Iyo

REF NCADACSF
REF NCADACO1
REF NCADACO2

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - GIDH** with 20 mL of **R1 - BUFFER** (practically all the bottle). Mix gently and let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The **WORKING REAGENT** is stable 3 days at 2-8°C.

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R3 - CAL** with 1 mL of distilled water; don't use saline or PBS, only distilled water!

Mix kindly till complete dissolution. Let the reagent reach the room temperature before use. Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

CAUTION

The Calibrator is from human origin and has to be used as a potential transfer of infective pathologies. This product has been tested and found to be negative for HIV, HCV and HBsAg antibodies by an approved method. Because no test method can offer complete assurance that all infectious agents are absent, it is recommended that this product and all the samples be handled as though capable of transmitting infectious disease.

STABILITY OF CALIBRATOR

The calibrator is stable:

- 5 days is stored at 2-8°C;
- till 3 months at -20°C, fractionated in small volumes. FREEZE only ONE TIME. DO NOT REPEAT FREEZING.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL.

Disposable micropipettes tips .

Transparent glass tubes for sample dilution.

Saline solution, distilled water, Calibrators and Controls.

Spectrophotometer or automatic analyzer for Clinical Chemistry.

SAMPLES

• Not haemolysed and not lipemic fresh serum.

• Not haemolysed fresh pleuric liquid.

• Not haemolysed fresh cerebrospinal fluid (CSF).

Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS)

(see References 3).

WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

ANALYTICAL PROCEDURE ON MANUAL

SPECTROPHOTOMETER

- Wavelength: 340 nm (334-365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: end-point
- Reaction: 3 minutes
- Sample/reagent: 1/20

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:

R/B: Reagent Blank, ST: Calibrator, S: Sample

	S	ST
WORKING REAGENT	1000 µL	1000 µL
Sample	50 µL	----
Calibrator	----	50 µL

Mix carefully and incubate for 4 minutes at 37°C.

Measure the initial absorbances for Calibrator (Ast) and Sample (As).

Repeat the readings for at least 3 times at intervals of one minute. Determine the average of the readings of absorbance/minute for Calibrator (ΔAst/min) and Sample (ΔAs/min).

ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analyzers could be completely different by what has been developed as manual determination.

REFERENCE VALUES (see References 4, 5, 6)

Normal Values ADA: 6.8 – 18.2 U/L.

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

CALCULATION

Insert the means found in the following formula:

Adenosine Deaminase (U/L 37°C) =

$$\text{values of Calibrator} \times \frac{\Delta\text{As/min. Sample}}{\Delta\text{Ast/min. Calibrator}}$$

ANALYTICAL PROCEDURE WITH CSF on MANUAL SPECTROPHOTOMETER

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Is the same of the kit, except for the Calibrator and Control. To calibrate with CSF has to be used a particular ADA Calibrator for CSF at low concentration (**REF** NCADACSF).

To grant the correct test performances we suggest to use ADA Control for CSF (**REF** NCADACO2) (see the relative insert).

- Wavelength: 340 nm (334-365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: end-point
- Reaction: 5 minutes
- Sample/reagent: 1/4

Let reagents reach the working temperature before use.



ADA (Adenosine Deaminase)

IVD

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:
R/B: Reagent Blank, ST: Calibrator, S: Sample

	S	ST
WORKING REAGENT	1000 µL	1000 µL
Sample	250 µL	----
Calibrator	----	250 µL

Mix carefully and incubate for 4 minutes at 37°C.
Measure the initial absorbance for Calibrator (Ast1) and Sample (As1).
Repeat the readings 5 minutes later for Calibrator (Ast2) and Sample (As2).

Calculate the differences of absorbance/5 minutes for
Calibrator $\Delta Ast/5min = Ast1 - Ast2$ and
Sample $\Delta As/5min = As1 - As2$

ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analyzers could be completely different by what has been developed as manual determination.

REFERENCE VALUES (see References 1)

Not available Reference Values for CSF in literature.

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

CALCULATION

Insert the values found in the following formula:

Adenosine Deaminase (U/L 37°C) =

$$\frac{\Delta As/5min. Sample}{\Delta Ast/5min. Calibrator} \times \text{values of ADA Calibrator for CSF}$$

ADDITIONAL NOTE with CSF

- For Calibration in automation we suggest to apply as follows:
CAL 1 ---- Distilled water (conc. 0.0)
CAL 2 --- Calibrator for CSF (conc. mentioned in Cod. ADACSF)
- We suggest don't dilute further the Calibrator for CSF.
If absolutely required, REM to dilute the Calibrator for CSF ONLY with distilled water.

USE IMMEDIATELY: stability at 2-8°C no more than half an hour.

ANALYTICAL PERFORMANCES

(validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent ADA (Adenosine Deaminase) have been tested with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

Method Limitations: are not know limitations.

Method Linearity: the test is linear up to 150 U/L.

However, for ADA concentrations higher than 150 U/L, it is recommended to dilute the sample 1:4 with saline solution, test again and multiply the result x 4.

Method Sensitivity (LoD): the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 1.9 U/L.

Interferences: see References 2.

Interference test criterion: recovery $\pm 10\%$ of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 10 mg/dL;
- haemoglobin up to 300 mg/dL,
- ascorbic acid up to 50 mg/dL.

Within-run Precision: determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (U/L) $\pm 2s$	CV %
Human 1	42.4 \pm 1.8	2.2
Human 2	8.5 \pm 1.4	8.5

Run-to-run Precision: determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (U/L) $\pm 2s$	CV %
Human 1	42.9 \pm 2.1	2.5
Human 2	8.9 \pm 1.2	6.6

Accuracy: a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

Linear regression equation $y = 1.0013x + 0.163$
Correlation coefficient $r = 0.9993$ $n = 20$

REFERENCES

- Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
- Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
- CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Lab. Tests.
- Martinek R.C., Clin. Chem. 9, 620 (1963).
- Delia S. et al., Clin. Chem. 33, 1675 (1987).
- Internal study Maruho Co cod. 5502543.

EDMA (EDMS) CODE 11 01 01 90 00