

# Estandarización de la técnica de adenosina deaminasa, un aspecto crítico en la ayuda diagnóstica para tuberculosis

Marlen Cristina Valencia Molina<sup>1</sup>, Mónica Soto Velásquez<sup>2</sup>,  
Santiago Estrada Mesa<sup>3</sup>

**Resumen:** la tuberculosis es un problema de salud pública y se hace necesario contar con métodos de laboratorio que permitan apoyar su diagnóstico oportuno. A pesar de las diferencias reportadas en cuanto a sensibilidad y especificidad de la técnica para la determinación de la enzima adenosina deaminasa, su medición se ha utilizado en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, ya que participa principalmente en el catabolismo de las purinas en la diferenciación y proliferación linfocítica que se presentan como respuesta ante antígenos micobacterianos. El objetivo de este estudio fue estandarizar la técnica para la medición de adenosina deaminasa en líquidos de cavidades estériles, así como analizar los factores que podrían afectar el resultado final. Con este fin se recolectaron 100 muestras de líquidos de cavidades estériles, con diferentes aspectos y condiciones de almacenamiento. Para su análisis se empleó la técnica que recomienda el Instituto Nacional de Salud, institución que realizó el control externo del proceso. Se logró estandarizar la técnica con resultados similares a los obtenidos en el Instituto Nacional de Salud. Se concluyó que el utilizar muestras almacenadas por más de 24 horas a temperaturas inferiores a -20°C, turbias o purulentas de las que se aísle algún microorganismo diferente a *Mycobacterium tuberculosis*, o que presenten algún grado de hemólisis afectan los valores finales de la enzima y podrían aumentar el porcentaje de falsos positivos para tuberculosis.

**Palabras clave:** adenosina deaminasa, tuberculosis, técnica, muestras, control de calidad.

**Valencia-Molina MC, Soto-Velásquez M, Estrada-Mesa S.** Estandarización de la técnica de adenosina deaminasa, un aspecto crítico en la ayuda diagnóstica para tuberculosis. *Medicina & Laboratorio* 2006; 12: 169-179.

Módulo 31 (Trabajo original), número 1. Editora Médica Colombiana S.A., 2006®.



La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa producida en el hombre, por dos especies de micobacterias, *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. Usualmente la infección inicial compromete el pulmón, pero puede diseminarse y producir enfermedad en cualquier sistema [1]. Diariamente más de 20.000 personas desarrollan tuberculosis activa y 5.000 mueren por su causa. Colombia está ubicada de acuerdo a su tasa de incidencia en el rango de 25 a 49 casos por 100.000 habitantes [2].

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en dos métodos de laboratorio: la baciloscopia cuya sensibilidad es del 60% y el cultivo con una sensibilidad cercana al 90% el cual requiere entre 3 a 6 semanas para el crecimiento de la micobacteria [1]. Estas pruebas, por tanto, no

<sup>1</sup> Bacterióloga y laboratorista clínica. Laboratorio Clínico Santa María, Congregación Mariana, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Médica experta en enfermedades infecciosas. Profesora de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Médico microbiólogo. Director Científico del Laboratorio Clínico Santa María, Congregación Mariana, Medellín, Colombia.

son suficientemente oportunas en el sentido clínico, pues retardan una decisión terapéutica apropiada. Actualmente los esfuerzos se dirigen hacia la búsqueda de una prueba con igual sensibilidad al cultivo, pero con resultados en menor tiempo [1,3-5]. En este contexto, se han desarrollado pruebas diagnósticas como la búsqueda de antígenos específicos por radioinmunoensayo, hibridación de ácido nucléico, luciferasa, tuberculina, Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), cultivo en capa delgada, detección directa de la bacteria mediante el uso de bacteriófagos y de anticuerpos IgG contra el factor TDM de la pared de este microorganismo, empleando una técnica de ELISA así como la determinación de los niveles de la enzima adenosina deaminasa (ADA).

ADA es una enzima que participa en el catabolismo de las purinas, catalizando la deaminación de adenosina para formar inosina y amoníaco y por ello ejerce su actividad prácticamente en todos los tejidos. Su acción fisiológica está relacionada con la proliferación y diferenciación linfocítica, por lo tanto su deficiencia se asocia con una inmunodeficiencia que afecta a las células T y B [6]. Por el contrario, sus niveles se encuentran elevados en procesos inmunes mediados por células, teniendo más relación con el estado de maduración que con el número de linfocitos T. La elevación de ADA en líquidos corporales, se ha utilizado como un marcador indirecto de empiema, meningitis o peritonitis tuberculosa en las que hay aumento en la actividad linfocítica en respuesta a los antígenos de la micobacteria [1]. La determinación de la actividad de ADA en suero no se utiliza en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar por su baja especificidad, pues se encuentra aumentada en otro sin número de entidades infecciosas y no infecciosas [7 y 8].

Existen 3 isoformas de ADA, ADA<sub>1</sub>, ADA<sub>1-cp</sub> y ADA<sub>2</sub>, esta última, sintetizada exclusivamente por monocitos y macrófagos, para ella, un estudio reportó una sensibilidad del 100% y especificidad del 86.4% en el diagnóstico de meningitis tuberculosa [9].

La medición de ADA total ha tenido un gran uso y se le ha atribuido un alto valor diagnóstico en muchas partes del mundo [3]. Su utilidad ha sido lo suficientemente validada en varios trabajos como para poder aceptarla como un método de rutina en la ayuda diagnóstica de la tuberculosis extrapulmonar [10].

Dado el valor que se le ha atribuido a la técnica en el diagnóstico de tuberculosis y las diferencias reportadas en cuanto a su sensibilidad y especificidad [3,7], el objetivo de este trabajo, fue estandarizar la técnica de medición para la enzima adenosina deaminasa total, identificando condiciones propias de la muestra, de su procesamiento y conservación, que afectan el valor final y por ende su utilidad.

---

## Materiales y métodos

### Recolección de muestras

Se recolectaron 100 muestras de: líquidos cefalorraquídeo, pleurale, pericárdico y peritoneal, que llegaron al laboratorio clínico de la Clínica Universitaria Bolivariana (CUB) en el periodo comprendido entre el 16 de agosto y el 8 de octubre del 2003. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos con el fin de identificar hemólisis. Según recomendaciones del Instituto Nacional de Salud (INS), las muestras deben ser almacenadas a -20°C o permanecer máximo 24 horas a 4°C antes de ser congeladas [11]. Para la recolección de estas no se tuvo en cuenta ningún parámetro de selección, en cuanto a la temperatura de almacenamiento y el aspecto de la muestra, con el fin de analizar los factores que en ellas se pueden presentar y que alteran los resultados.

## **Preparación de reactivos**

Se prepararon las soluciones madre necesarias para realizar las curvas de calibración y para el posterior procesamiento de las muestras. Se elaboraron los siguientes reactivos que fueron almacenados a 4°C:

- Buffer fosfato a una concentración final (CF) de 50 mM y pH de 6.5, que contenía fosfato ácido de sodio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y fosfato dibásico de sodio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- Solución de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . CF 15 mM
- Solución de fenol 106 mM, Nitroprusiato 0.17 mM
- Solución de hipoclorito alcalino 11mM  $\text{NaClO}$ , 125 mM  $\text{NaOH}$

## **Curva de calibración**

Para comprobar la calibración del fotocolorímetro a utilizar (Spectronic 20 de Milton Roy Company), se leyó 3 veces la absorbancia de cada patrón, en un espectofotómetro ya calibrado (Biorad, Start Spect™ 3.000), facilitado por la Unidad de Biología Molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), obteniendo un promedio de las lecturas, que fue comparado con los valores obtenidos en el fotocolorímetro. En ambos casos se leyó a una densidad óptica de 628 nm, contra un blanco de reactivo. Los valores se ubicaron en una gráfica de absorbancia versus concentración.

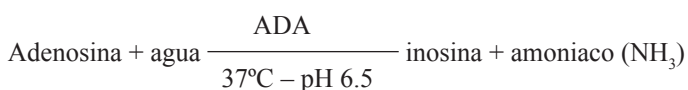
El método es lineal a una concentración entre 25 y 75 U/L, para comprobar dicho aspecto, se realizó una curva de calibración con concentraciones de 25, 37,5, 50, 62,5 y 75 U/L a partir de las soluciones de sulfato de amonio y buffer fosfato.

Se utilizó 400  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato como blanco y la misma cantidad para cada uno de los patrones. Se incubaron en baño María a 37°C durante 60 minutos. Pasado este tiempo, se agregó 1.200  $\mu\text{l}$  de fenol nitroprusiato, se mezcló inmediatamente, luego, se adicionó 1.200  $\mu\text{l}$  de hipoclorito alcalino, se mezcló nuevamente, se taparon y por último, se llevaron a incubar a baño María a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se realizó la lectura de las absorbancias de los patrones a 628 nm contra el blanco [11].

Los patrones se prepararon en 3 días consecutivos, uno cada día y se almacenaron a 4°C, con el fin de determinar su estabilidad después de su elaboración. Se utilizaron las designaciones A, B, y C, para los patrones. Luego, para cada uno se realizó una curva de calibración y una regresión lineal.

## **Procesamiento de las muestras y medición de ADA**

La técnica para la determinación de ADA, se basa en la cuantificación de amoniaco producido al poner en contacto la adenosina (sustrato) con la adenosina deaminasa, presente en la muestra, en condiciones adecuadas de pH, tiempo y temperatura. El amoniaco producido es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra [11].



Se incluyó un blanco para cada una de las muestras, un blanco de adenosina, un blanco de reactivo cuya absorbancia no debe ser mayor de 0,040 leído contra agua destilada y el patrón III (50 U/L), preparado previamente [11].

Aplicando la técnica para la determinación de ADA establecida en el protocolo del INS, se marcaron 5 tubos como blanco de reactivo, blanco de adenosina, patrón, blanco de muestra y muestra. En el primero se sirvió 200 µl de buffer fosfato y 10 µl de agua destilada, en el segundo 200 µl de adenosina más 10 µl de agua destilada, en el tercero 100 µl del patrón a utilizar y 10 µl de agua destilada, en el tubo para blanco de la muestra, se sirvió 200 µl de buffer fosfato y 10 µl de la muestra y en el último, 200 µl de solución de adenosina más 10 µl de la muestra.

Luego, se llevó a incubar en baño María a 37°C por 60 minutos. Pasado este tiempo a cada tubo se le adicionó 600 µl de fenol nitroprusiato, se mezclaron y se les agregó 600 µl de hipoclorito alcalino, se mezclaron nuevamente, se taparon y se llevaron a incubar en baño María a 37°C por 30 minutos.

Finalmente se leyó todo a una absorbancia de 628 nm, llevando a cero contra agua destilada.

La concentración de ADA en U/L se determinó utilizando la siguiente fórmula [11]

$$\text{Actividad: } \frac{A - B}{C} \times D: \text{ U/L a } 37^{\circ}\text{C}$$

Siendo:

A= (Abs. Muestra) – (Abs. blanco muestra)

B= (Abs. blanco adenosina) – (Abs. blanco reactivo)

C= (Abs. Patrón) – (Abs. Blanco de reactivo)

D= Concentración del patrón utilizado

Abs.= absorbancia

Luego de realizar la medición de ADA en cada uno de los líquidos, se observó la influencia en sus niveles, del aspecto de la muestra, temperatura de almacenamiento, tiempo de permanencia a 4°C, el descongelar varias veces y si en su cultivo se obtuvo crecimiento de algún microorganismo.

Controles externos: Se envió un número de 20 muestras al INS como control de calidad externo que incluían todas las clases de líquidos analizados. Además, los resultados se compararon con los obtenidos en otro laboratorio de la ciudad.

---

## Resultados

### Calibración del equipo y de la técnica

#### Calibración del fotolorímetro Spectronic 20

Al comparar las absorbancias obtenidas en el fotolorímetro Spectronic 20, de los patrones preparados a diferentes concentraciones, con los obtenidos en el equipo Biorad, Start Spect™ 3.000, ya calibrado, no se observaron diferencias significativas.

### Curvas de calibración de la técnica

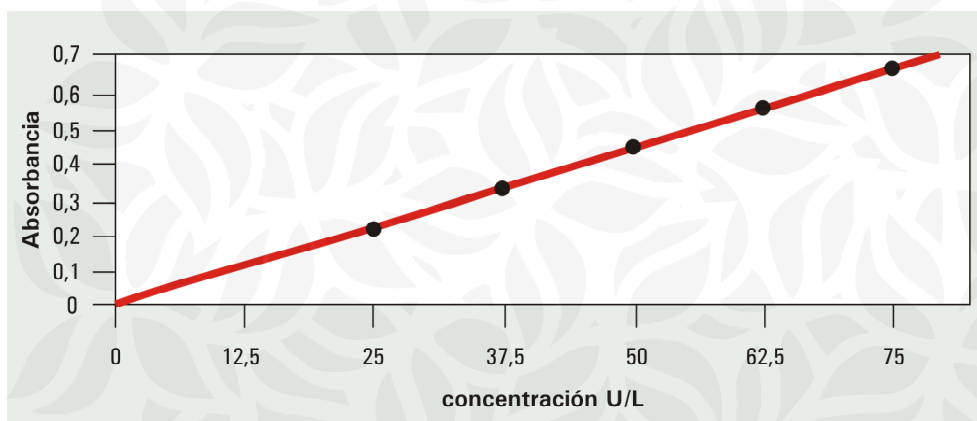
La comparación de las curvas de calibración de los patrones A, B y C, preparados en diferentes días a concentraciones diferentes pero conocidas, generaron mediciones con variación no significativa en los valores de absorbancia entre los patrones de igual concentración y se obtuvieron 3 curvas de calibración con una pendiente entre 0,97 y 1,1 (**Tabla 1**, Gráfica).

**Tabla 1.** Datos de las curvas de calibración

Patrón	Absorbancia de patrones					Regresión lineal			
	I 25 U/L	II 37,5U/L	III 50 U/L	IV 62,5U/L	V 75 U/L	a*	b**	Ángulo	% de error
A	0,216	0,325	0,444	0,530	0,638	1,28	0,97	44,96	-0,08
B	0,219	0,326	0,447	0,554	0,663	-0,6	1,01	44,99	-0,02
C	0,194	0,338	0,456	0,569	0,684	-4,2	1,1	44,96	-0,08

\* Punto de intersección de la línea operacional con el eje y.

\*\* Pendiente de la línea operacional



### Muestras y pacientes

Se procesaron 100 muestras de las cuales 34 eran LCR (34%), 22 (22%) correspondían a líquidos pleurales, 43 (43%) peritoneales y 1 (1%) pericárdico. De 71 pacientes, 36 eran de género masculino, con una edad promedio de 57 años, 30 de género femenino, con una edad promedio de 49 años y 5 neonatos.

Según valores obtenidos en el laboratorio de micobacterias del INS, los niveles compatibles con tuberculosis está por encima de 32 U/L en líquido pleural, de 5 U/L en LCR, de 96 U/L en líquido pericárdico y de 36 U/L en líquido peritoneal [11]. En el presente estudio se consideraron muestras positivas para ADA aquellas cuyo resultado fue superior a los valores de referencia y negativas cuando los valores eran inferiores. De las 100 muestras, 27 fueron positivas para ADA y solo 1 de ellas fue positiva para tuberculosis pleural, las restantes se asociaron en su mayoría con infecciones bacterianas de otra etiología (**Tabla 2**).

Con las muestras, se realizó la medición de 20 controles de concentración de 50 U/L, utilizando el control III C preparado para la curva de calibración. La media de sus absorbancias fue de 0,496 y el valor de referencia determinado para estos fue de 0,434 a 0,558, con una desviación

**Tabla 2.** Diagnósticos diferentes a tuberculosis en los que se obtuvieron valores de ADA mayores a los valores de referencia.

Muestra	VR U/L	ADA U/L	Diagnóstico
LCR	< 5	7	Trombosis venosa profunda, neumonía, sinusitis, celulitis
LCR	< 5	13	Neumonía
LCR	< 5	16	HIV *, meningoencefalitis por <i>C. neoformans</i>
L. pleural	< 32	37	Lupus eritematoso sistémico, derrame pleural, neumonía
L. pleural	< 32	141	Neumonía, empiema
L. pleural	< 32	218	Bronconeumonía, derrame pleural
L. pleural	< 32	82	Cáncer broncogénico, encefalopatía, IRC **
L. peritoneal	< 36	178	Megacolon ganglionar
L. peritoneal	< 36	46	Úlcera péptica perforada
L. peritoneal	< 36	46	Preeclampsia
L. peritoneal	< 36	257	Absceso de pared abdominal
L. peritoneal	< 36	51	Colecistitis, peritonitis biliar por <i>E. coli</i> , hepatitis A, DM1***
L. peritoneal	< 36	168	Colecistitis, peritonitis biliar por <i>E. coli</i> , hepatitis A, DM1***
L. peritoneal	< 36	103	Peritonitis
L. peritoneal	< 36	52	Peritonitis
L. peritoneal	< 36	39	Peritonitis
L. peritoneal	< 36	48	Sepsis abdominal por <i>C. albicans</i> o <i>C. dubliniensis</i>
L. peritoneal	< 36	46	Sepsis abdominal por <i>K. pneumoniae</i>
L. peritoneal	< 36	152	Sepsis abdominal por <i>K. pneumoniae</i>
L. peritoneal	< 36	111	Sepsis abdominal por <i>P. aeruginosa</i>
L. peritoneal	< 36	94	Malaria, tromboflebitis y shock séptico, endometritis
L. peritoneal	< 36	66	Colangiocarcinoma, HTA**** desnutrición
L. peritoneal	< 36	125	Colangiocarcinoma, HTA**** desnutrición
L. peritoneal	< 36	162	Colangiocarcinoma, HTA**** desnutrición
L. peritoneal	< 36	82	Colangiocarcinoma, HTA**** desnutrición

\* HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; \*\* IRC: Insuficiencia Renal Crónica; \*\*\* DM 1: Diabetes Mellitus tipo 1; \*\*\*\* HTA: Hipertensión Arterial

estándar. Además, en las mediciones de la absorbancia del blanco de reactivo contra el blanco de agua destilada, el 92% de las veces fue menor de 0,040, en un rango de 0,013 y 0,037, con una media de 0,025.

En cuanto a los diagnósticos de tuberculosis, sólo 1 de los 100 pacientes tenía tuberculosis pleural, y su nivel de ADA en líquido pleural fue de 64,4 U/L (Valor de referencia (VR) :<32 U/L). Otro paciente al que se le sospechaba tuberculosis, pero que finalmente se le descartó la enfermedad tuvo un valor de 2 U/L de ADA en LCR (VR:<5 U/L). Un tercer paciente con secuelas de tuberculosis, tuvo un valor de 2 U/L (VR:<5 U/L) de ADA en LCR y en su baciloscopia no se observaron bacilos ácido alcohol resistente. En los tres casos, los niveles de ADA se relacionaron con el diagnóstico y cultivo del paciente, De las muestras negativas para ADA en ninguna se hizo diagnóstico de tuberculosis.

Con respecto a los cultivos, de 100 muestras analizadas, 27 tuvieron crecimiento de hongos o bacterias y 17 de estas muestras (63%) tuvieron valores positivos para ADA. Los microorganismos aislados en ellas fueron *Staphylococcus coagulans* negativa, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* o *Candida dubliniensis*.

Con la medición de los niveles de ADA en todos los líquidos, se observó que su aspecto influía en los resultados, teniéndose que el 51% de las muestras de aspecto turbio, hemolizado o purulento, presentaban niveles positivos para ADA y solo el 11% de las muestras de aspecto normal, fueron positivas, de éstas, la mitad habían sido almacenadas por más de 24 horas a 4°C (**Tabla 3**).

Al comparar los niveles de ADA de las muestras almacenadas a una temperatura adecuada (ver recolección de muestras) con aquellas que se mantuvieron a 4°C por más de 24 horas, se observó que el 37% de las últimas fueron positivas para ADA, mientras que sólo el 24% de las muestras que se almacenaron correctamente, presentaron valores positivos (**Tabla 4**).

Por otra parte, en una de las muestras correspondiente a un líquido peritoneal, que había sido separado en dos alícuotas, una almacenada a 4°C y la otra a temperatura ambiente, durante 24 horas antes de ser congeladas a -20°C, se observó una disminución de 12 U/L en el valor de ADA de la muestra a temperatura ambiente (ADA de 7 U/L) en comparación con la que fue almacenada a 4°C (ADA de 19 U/L).

Al confrontar los resultados de los valores de ADA obtenidos en nuestro estudio, con los del INS, usados como control externo y con los de otro laboratorio de la ciudad, se encontró que los valores obtenidos en el proceso de calibración de ADA en nuestro laboratorio, fueron semejantes a los obtenidos en el INS, con una correlación del 95% (en 19 de las 20 muestras comparadas). Con respecto al otro laboratorio de Medellín, se encontraron discrepancias significativas comparándolos con el INS y el nuestro.

Al comparar los resultados de las muestras que fueron determinados por repetición del proceso en días diferentes, se encontraron variaciones mínimas entre ellos. El 22% de estas muestras tuvieron una interpretación diferente en la repetición, pasando de tener valores mayores a los niveles de referencia a valores normales o viceversa.

**Tabla 3.** Influencia del aspecto de la muestra en los valores de ADA.

Muestras			
Características	Total	Positivas para ADA	
		Cantidad	Porcentaje
Turbias	19	8	42 %
Hemolisadas	10	7	70 %
Purulentas	4	4	100 %
Hemolisadas, turbias y/o purulentas	8	2	25 %
Incoloras	2	0	0 %
Normales	57	6	11 %
Total	100	27	27 %

**Tabla 4.** Cantidad de muestras positivas para ADA según la temperatura de almacenamiento.

Muestras				
Temperatura	Tiempo	Total	Positivas para ADA	
			Cantidad	Porcentaje
4°C	> 24 horas*	32	12	37 %
4°C	24 horas*	28	9	32 %
-20°C	Inmediatamente	40	7	17 %
Adecuado almacenamiento	24 horas a 4°C o inmediatamente a -20°C	68	16	24 %

\* Tiempo que se mantuvieron las muestras a 4°C antes de ser centrifugadas y almacenadas a -20°C

## Discusión

En las curvas de calibración realizadas con patrones preparados en tres días diferentes, la mínima variación en las absorbancias de cada patrón, así como los valores de la pendiente (**Tabla 1**), muestran una excelente reproducibilidad de las mediciones y un patrón de linealidad de la relación concentración y absorbancia [11]. Además, el hecho de que la absorbancia del control de 50 U/L, siempre estuviera en el rango de 0,434 a 0,558, indica que después de preparado este, es estable hasta por un mes.

La linealidad de una técnica se emplea para determinar el rango analítico del método [12], por lo tanto, se puede asegurar que la técnica estandarizada es lineal hasta 75 U/L, correspondiente a una absorbancia promedio de 0,6, sin embargo, el INS recomienda que sólo cuando la absorbancia sea mayor de 1,0 se debe diluir la muestra [11].

El hecho de que el 92% de las veces en que se realizó la medición del blanco de reactivo, su diferencia contra el blanco de agua destilada fuera menor de 0,040, confirma la limpieza del material y de los reactivos utilizados [11].

Teniendo en cuenta que la principal limitación de este estudio es el bajo número de muestras analizadas con diagnóstico confirmado de tuberculosis, el hecho de que sólo 1 de las 27 muestras con valores de ADA mayores a los de referencia, correspondiera a un paciente con tuberculosis pleural y el resto a otros diagnósticos, podría indicar un bajo valor predictivo positivo de la prueba para tuberculosis, entendiéndose este valor como la proporción de personas que están verdaderamente enfermas [13], sin embargo, el valor predictivo negativo en este estudio fue del 100%, que corresponde a la proporción de personas con pruebas negativas que no tenían tuberculosis. Según Ortiz [3], la determinación adecuada del valor predictivo positivo y negativo, es un hecho de gran trascendencia, pues atribuir un valor predictivo positivo mayor que el real sobredimensionará el valor de la prueba, indicando que un resultado positivo confirma con alta probabilidad el diagnóstico de la enfermedad y un valor predictivo negativo mayor que el real, indicará que un resultado negativo, determina con alta probabilidad la ausencia de enfermedad. Principalmente el primer hecho no se aplica en este estudio. Por su parte, Sanín [7], reporta una sensibilidad del 95 al 99,6% de la prueba e indica que numerosos estudios han demostrado que la sensibilidad de ADA como marcador individual de tuberculosis, es mayor que la de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), el interferón gamma e incluso la biopsia o el cultivo para micobacterias, consideradas las pruebas oro en el diagnóstico de tuberculosis paucibacilar por *M. tuberculosis*. Caminero [10] también indica que se ha reportado una elevada sensibilidad y especificidad para la prueba, siendo superior al 95% en ambos aspectos.

Marcelo A. y otros demostraron que la actividad de ADA en LCR de pacientes con tuberculosis meníngea fue mayor que en otras enfermedades del sistema nervioso central [14], sin embargo como se observó en este estudio, el aumento de los valores de ADA en otros diagnósticos diferentes a tuberculosis, muestran la importancia de correlacionar los niveles de ADA en una muestra, con la historia clínica del paciente y otros exámenes, ya que como lo indica el INS, la determinación de ADA es útil sólo como ayuda diagnóstica [11].

De las muestras que presentaron crecimiento bacteriano, un alto porcentaje (63%) tuvieron valores de ADA mayores a los valores de referencia para cada líquido, lo cual se explica en el hecho de que en el metabolismo bacteriano sea importante la presencia de amonio, por su aporte de átomos de nitrógeno [15] y la liberación de amonio produce falsos positivos en la interpretación de resultados [11].



Es importante también tener en cuenta el aspecto de la muestra para correlacionarlo con el resultado, ya que como se observó (**Tabla 3**), en las muestras con aspecto turbio, hemolisado o purulento, el número de resultados positivos para ADA fue mayor que el de las muestras de aspecto normal, es decir, en muestras con las primeras características, se aumenta el porcentaje de falsos positivos, hecho que puede explicarse, en las muestras turbias por la influencia de su aspecto en la lectura de la absorbancia; en las muestras purulentas por la presencia en ellas de microorganismos y en las hemolisadas, debido a que los eritrocitos humanos tienen alto contenido de ADA [11].

También se observó un aumento en el porcentaje de las muestras positivas para ADA que fueron almacenadas a 4°C por más de 24 horas en comparación de las almacenadas adecuadamente (**Tabla 4**). Este aumento de falsos positivos en muestras que no fueron congeladas en el tiempo adecuado, pudo ser causado por la liberación de enzimas y sustratos que se produce con el deterioro y porosidad de las membranas celulares, así como en la lisis de las células de las muestras no congeladas [16]. Los resultados reportados como normales en estas muestras, tampoco son totalmente confiables dado que en este caso se pudo haber presentado falsos negativos explicados por una posible inactivación de la enzima.

Las variaciones mínimas en los valores de ADA, obtenidos en las muestras que fueron repetidas, se pueden deber a que estas se mantuvieron a temperatura ambiente por periodos cortos inferiores a una hora, mientras se procesaban.

---

## Conclusiones

Para la determinación de ADA es necesario contar con una técnica que arroje resultados confiables, para ello se debe asegurar una excelente reproducibilidad, linealidad y control de calidad. Dichos resultados deben ser utilizados sólo como ayuda diagnóstica de tuberculosis, teniendo siempre en cuenta la calidad de la muestra y la historia clínica del paciente, además de una especial precaución en la interpretación de resultados positivos para ADA de muestras hemolisadas, con aspecto turbio o purulento de las que se aísle algún microorganismo o que se almacenen a temperaturas superiores a -20°C por más de 24 horas, pues aumentan los falsos positivos para tuberculosis. Estos datos relacionados con el aspecto de la muestra deben reportarse en el informe.

Cuando las muestras se descongelen para su procesamiento, no deben permanecer a temperatura ambiente por más de 1 hora. De lo contrario, se puede alterar la estabilidad de la enzima adenosina deaminasa.

No fue posible determinar el valor predictivo positivo de la prueba para tuberculosis, por los pocos casos de tuberculosis diagnosticados que se tenían. Por la misma razón, el dato obtenido como valor predictivo negativo, porcentaje de sensibilidad y especificidad de la prueba no son precisos.

Se recomienda que en posteriores estudios se estandarice la técnica para la medición de la isoenzima ADA<sub>2</sub>, que es más específica para el diagnóstico de tuberculosis meníngea, como consecuencia del incremento de la línea celular monocito-macrófago en LCR.

---

## Agradecimientos

Al laboratorio clínico y la facultad de medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), por su apoyo técnico.

Al laboratorio de micobacterias del Instituto Nacional de Salud, por haber realizado el control externo del proceso.

Al laboratorio Departamental de Antioquia, por la capacitación técnica.

**Summary:** tuberculosis is a public health problem that needs to count with laboratory methods that allow to support its on time diagnosis. In spite of differences published about sensitivity and specificity of the technique for adenosine deaminase determination, its measurement has been used in the diagnosis of extra pulmonary tuberculosis. Although of it is ubiquity, adenosine deaminase mainly participates in purines catabolism in differentiation and linfocitic proliferation process that appear like answer against mycobacterian antigens. The objective of this study was to standardize the technique for the measurement of adenosine deaminase in liquids of sterile cavities, as well as to analyze the factors that could affect the final result. With this propose, 100 samples of liquids from sterile cavities were collected, with different aspects and storage conditions. For the analysis was used the technique that recommends the National Institute of Health, institution that also made the external control of the process. The standardization of the technique with similar results to the obtained ones in the National Institute of Health was achieved and we can concluded that using samples stored by more than 24 hours under temperature of -20°C, cloudy or purulent of which some microorganism different to *Mycobacterium tuberculosis* can be isolate, or that display some hemolytic degree, affect the final values of the enzyme and could increase the percentage of false positives for tuberculosis.

**Keywords:** adenosine deaminase, tuberculosis, tecnic, samples, quality control.

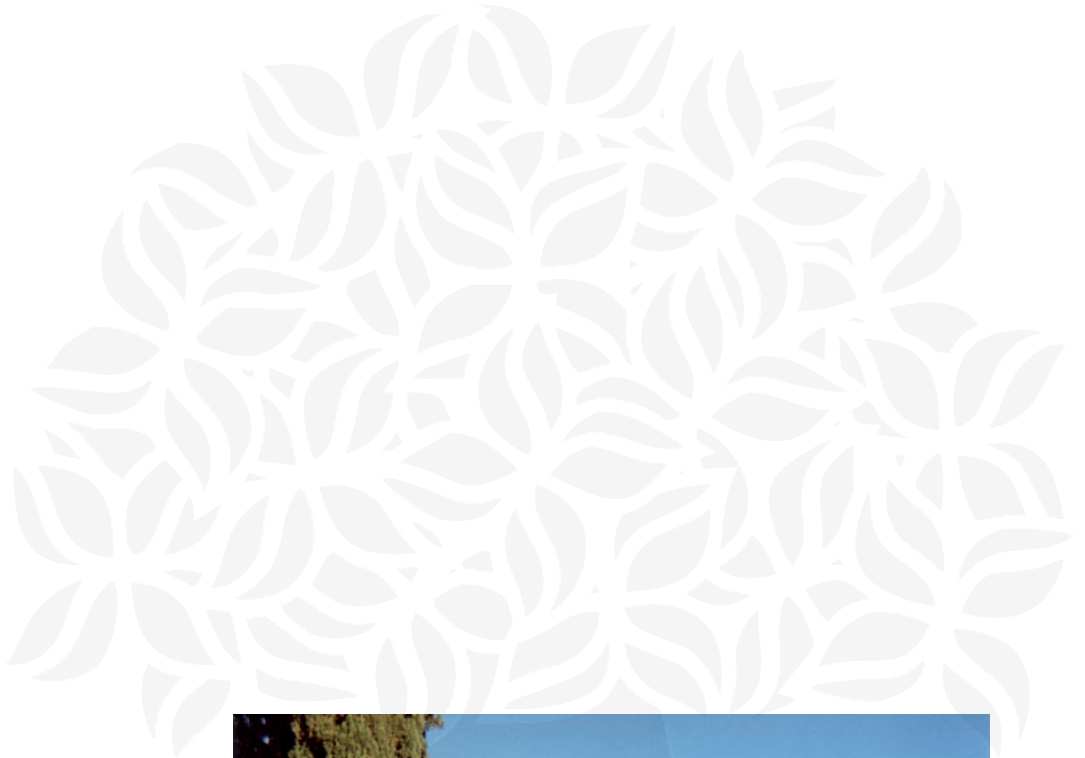
**Valencia-Molina MC, Soto-Velásquez M, Estrada-Mesa S.** Standardization of adenosine deaminase technique, a critical aspect in the diagnostic support for tuberculosis. *Medicina & Laboratorio* 2006; 12: 169-179.

Módulo 31 (Trabajo original), número 1. Editora Médica Colombiana S.A., 2006®.

## Bibliografía

1. **Tobón AM, Robledo J, Zuluaga A, Gómez C.** Micobacterias, bacilos gram positivos relacionados, rickettsias, chlamydias y micoplasma. En: Corporación para Investigaciones Biológicas, editores. *Enfermedades infecciosas*. 5ª ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1996. *Fundamentos de medicina*. p. 455-93.
2. Colombia. Ministerio de Salud. Dirección de epidemiología. *Boletín Epidemiológico Nacional*. Santa fe de Bogotá: Ministerio de Salud; 2003.
3. **Ortiz J.** El valor diagnóstico del test de ADA [Tesis en Internet]. Perú: Universidad Mayor de San Marcos; 2002 [acceso 21 de julio de 2003]. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Ortiz\\_S\\_j/t\\_completo.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Ortiz_S_j/t_completo.pdf)
4. **Robledo J, Mejía G.** Actualidad en el diagnóstico de la tuberculosis por el laboratorio. *Infectio*. 2001; 5(4): 251-7.
5. Aspectos relevantes del resurgir de la tuberculosis y perspectivas del manejo futuro. *Iladiba*. 2001; 15 (2): 11-6.
6. **Carrero I.** Inmunodeficiencias. [Monografía en Internet]. New York: Universidad Autónoma de Madrid; 1995 [acceso 4 de agosto de 2003]. Disponible en: <http://www.biopsicologia.net/fichas/page-7463.html>
7. **Sanín J, Pérez C.** Adenosin deaminasa. *Boletín Informativo*. Medellín: Prolab; 2003.
8. **Cavalcanti V.** Adenosina deaminase [Monografía en Internet]. Bello Horizonte: Instituto Hermes Pardini; 2003 [acceso 8 de septiembre de 2003]. Disponible en: <http://www.labhpardini.com.br/lab/bioquimica/ada.htm>
9. **Eintracht S, Silver E, Sonnenberg T, Koornhof H, Saffer D.** Analysis of adenosine deaminase isoenzyme - 2 (ADA2) in cerebrospinal fluid in diagnosis of tuberculous meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000; 69 (1): 137-40.
10. Métodos no convencionales y nuevas técnicas en el diagnóstico de tuberculosis. En: Caminero JA. *Guía de la tuberculosis para médicos especialistas*. París: Unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias; 2003. p. 153.
11. **Garzón C, Naranjo O, Sierra C, Llerena C, Orjuela D.** Determinación de adenosina deaminasa como ayuda diagnóstica. En: Instituto Nacional de Salud, editores. *Bacteriología del Mycobacterium tuberculosis y de micobacterias no tuberculosas*. Bogotá: División de Biblioteca y Publicaciones; 2001. p. 52-6. 69-70.
12. **Visitación NB.** Estandarización del método para determinación de una analito en química sanguínea. En: Instituto Nacional de Salud, editores. *Manual de garantía de calidad en química clínica y hematología*. Bogotá: División de Biblioteca y Publicaciones; 1998. p. 85-91.

13. **Gallo L.** Conceptos básicos para la interpretación de pruebas de las pruebas de laboratorio. *Laboratorio al Día*. 1995; 5 (3): 175-83.
14. **Marcelo A, Cisneros R, Barrón J.** Actividad de la isoenzima ADA<sub>2</sub> en líquido cefalorraquídeo como ayuda diagnóstica en tuberculosis meningea HNGAI. Septiembre 1999 – enero 2000 [monografía en Internet]. San Marcos: Universidad Mayor de San Marcos; 2000 [acceso 10 de agosto de 2003]. Disponible en: <http://www.unmsm.edu.pe/biologia/runion/9rs014.htm>
15. **Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn, W.** Bacteriología básica, conceptos de virulencia y avances tecnológicos en Microbiología clínica. Una reseña: diagnóstico microbiológico. 5ª ed. Bogotá: Panamericana; 1999.
16. **Gella FJ.** Utilidad diagnóstica de la medición de enzimas. En: Castilla FJ, editor. *Enzimología clínica*. Barcelona: Biosystems; 2003. p. 8.



DOMO DE LA ROCA, JERUSALEN, ISRAEL. SEPTIEMBRE DE 2005  
Carlos Alberto Lozano M., Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín