

## ARTÍCULOS ORIGINALES

### ACTIVIDAD SÉRICA DE LA ADENOSINA DEAMINASA (ADA) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR

Oswaldo Espinoza M., Luz Oyola de Bardales\* y Elizabeth Carranza A.

Departamento Académico de Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM

#### RESUMEN

Se realizaron determinaciones de actividad de la enzima adenosina deaminasa (ADA) (E.C. 3.5.4.4) en suero de 74 individuos adultos de ambos sexos, divididos en 2 grupos: 29 pacientes adultos con tuberculosis pulmonar activa y 45 individuos voluntarios sanos sin historia reciente o pasada de enfermedad tuberculosa, los cuales constituyen el grupo control. El valor promedio de actividad sérica de la enzima ADA en el grupo de enfermos con tuberculosis pulmonar fue de  $47.89 \pm 6.05$  U/L. En el grupo de individuos sanos, el valor promedio de actividad sérica de la enzima ADA fue de  $18.84 \pm 6.16$  U/L. La diferencia entre los promedios del grupo de tuberculosis y el grupo control resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) para el parámetro estudiado y los criterios de valoración mostraron los siguientes resultados: sensibilidad 100%, especificidad 91,11%, eficiencia 94,59%, valor predictivo positivo (VPP) 87,88% y valor predictivo negativo (VPN) 100%. En casos de alta prevalencia, el test de ADA en suero puede ser una prueba simple de gran valor diagnóstico. Se determinó la ADA sérica en pacientes con tuberculosis pulmonar y en individuos sanos, con el fin de evaluar la utilidad de la ADA sérica en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

**Palabras Clave:** ADA, tuberculosis pulmonar

#### ABSTRACT

Serum adenosine deaminase enzyme determinations were performed in 74 adult individuals of both sexes, consisting of 29 adult patients with active pulmonary tuberculosis, and 45 voluntary healthy individuals with no recent or past tuberculosis history, who constituted the control group. The mean value of ADA enzyme serum activity in the group of patients with pulmonary tuberculosis was  $47.89 \pm 6.05$  U/L, and in the group of healthy individuals,  $18.84 \pm 6.16$  U/L. The difference between the means of serum ADA enzyme activity in the tuberculosis patients and the mean value of the control group was statistically significant ( $p < 0,001$ ). The validation criteria showed the following results: sensitivity, 100%; specificity, 91.11%; efficiency, 94.59%; predictive value of positivity, 87.88%; predictive value of negativity, 100%. In the cases with high prevalence value, serum ADA test can be a simple test of high diagnostic value. We determined serum ADA in patients with pulmonary tuberculosis and in healthy individuals with the purpose of evaluating utility of serum ADA test in pulmonary tuberculosis diagnosis.

**Key words:** ADA, pulmonary tuberculosis

## INTRODUCCION

La tuberculosis pulmonar continúa siendo un grave problema de morbilidad y mortalidad en nuestro medio. Los bajos ingresos económicos de la mayoría de nuestra población, la desnutrición, el desconocimiento de las formas de contagio y de la enfermedad misma han sido siempre los agravantes que complican el pronóstico de salud de nuestra población.

En el Perú, las tasas de incidencia de tuberculosis pulmonar han alcanzado el término elevado BK (+); se ha comprobado que la tuberculosis pulmonar, registrada en el Ministerio de Salud Pública, ha ido aumentando progresivamente desde 1986 hasta 1997 (112,1 por cada 100 mil habitantes) (1), siendo el 48% de los casos notificados procedentes de Lima y Callao, debido a que son las zonas de mayor densidad poblacional.

El Ministerio recomienda como método fundamental y rutinario de análisis, el examen directo del esputo (Baciloscopía) para el establecimiento del diagnóstico de tuberculosis pulmonar y el seguimiento del tratamiento. La baciloscopía positiva (BK +) se considera definitiva para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, no siendo necesario ningún otro examen.

Otros métodos de diagnóstico para la tuberculosis pulmonar son: el examen bacteriológico y el test serodiagnóstico, basado en el ensayo de enzimas fijadas a inmunoabsorbentes (Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (2).

En 1974, Giusti (3) dió a conocer un método de análisis enzimático que permite evaluar indirectamente la actividad de la enzima

adenosina deaminasa (E.C. 3.5.4.4.) en determinadas muestras de tejidos corporales. Originalmente fueron evaluados sueros de pacientes con fiebre tifoidea o con otras enfermedades infecciosas y no infecciosas (4).

En 1992, en la India, Lakshimi y col. (5) utilizando la técnica original de Giusti investigaron la actividad de la enzima ADA en (1) suero de sujetos con signos y síntomas sugerentes de tuberculosis pulmonar. Ellos basaron su trabajo en que la ADA es un marcador bioquímico de la respuesta inmune; la enzima adenosina deaminasa (E.C. 3.5.4.4.) es actualmente considerada un indicador de la inmunidad mediada por células, cuya actividad incrementa durante la proliferación y diferenciación de inmunocitos de los tipos linfocitos y macrófagos (6).

En el Perú, no contamos con estudios acerca de la utilidad de la ADA sérica en el diagnóstico de la tuberculosis. Las fuentes bibliográficas consultadas son estudios de la actividad de la ADA en diversos fluidos orgánicos (LCR, líquido pleural, líquido ascítico, etc.) para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar (7,8,9,10). Sin embargo, estudios realizados en otros lugares como en la India (5), cuya prevalencia de tuberculosis pulmonar es tan alta como la nuestra, sugieren que los valores de la ADA sérica son suficientemente útiles en la identificación de este tipo de pacientes. Por eso creemos que el aumento de la actividad de la enzima en el suero de pacientes tuberculosos y su medida indirecta mediante el método de Giusti (técnica original) puede constituir un test de diagnóstico rápido y ser una alternativa de ayuda diagnóstica en este tipo de pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sujetos de Estudio

El estudio se realizó en 74 individuos, de los cuales 29 eran pacientes tuberculosos de ambos sexos y cuyas edades estaban comprendidas entre 19 y 45 años. Todos los pacientes fueron evaluados mediante un protocolo de exámenes auxiliares a fin de establecer el diagnóstico definitivo. El grupo control lo constituyeron 45 individuos voluntarios sanos, de ambos sexos y de edades entre 18 y 32 años.

### Material Biológico

Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas, por punción venosa y el suero separado dentro de la primera hora de obtención y almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis., dentro del término de una semana.

### Metodología

Para determinar la actividad enzimática de la adenosina deaminasa (ADA) se empleó el método original de Giusti (3). La ADA cataliza la deaminación hidrolítica irreversible de adenosina con la producción de inosina y amoníaco. El amoníaco es determinado por la reacción de Berthelot (11). La reacción catalizada por la ADA es detenida al final del período de incubación por la adición de una solución de fenolnitroprusiato. En esta técnica se midió 1,0 ml de una solución tamponada de adenosina (21 mM adenosina; 50 mM buffer de fosfato, pH 6,5) en sendos tubos y se añadió 0,05 ml de suero a uno de ellos (MP). Se mezclaron e incubaron en BM por 60' exactos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; se añadieron 3 ml de una solución de fenol-nitroprusiato de sodio (106 mM fenol; 0,17 mM nitroprusiato de sodio). Al otro tubo

(B<sub>MUESTRA</sub>) se le añade 0,05 ml de suero. A ambos tubos se agregó 3,0 ml de hipoclorito de sodio (11 mM; 125 mM NaOH). Se incubó nuevamente en BM por 30' a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se leyeron las absorbencias a 650 nm frente a agua destilada. Se preparó una curva estándar de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  0,75  $\mu\text{M}$ , se tomaron 0,2; 0,4; 0,8 y 1,0 ml del estándar, que corresponden a 0,03; 0,06; 0,12 y 0,15  $\mu\text{mol}$  de amoníaco liberado y que equivalen a 10, 20, 40 y 50 U/L.

### Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron en términos de valores medios y desviación estándar. Se aplicó la prueba *t* de Student para comparar medias no relacionadas. Se clasificó las respuestas según un punto crítico, de donde resultaron las estimaciones para el valor diagnóstico de la prueba.

### Valor diagnóstico del parámetro estudiado

El valor diagnóstico del parámetro estudiado fue evaluado mediante el siguiente criterio de valoración:

$X_{,95}$  = Representa un punto crítico por encima del cual la probabilidad de obtener un resultado en la población de sanos es menor de 0,05, y se puede considerar como punto de corte para sanos y enfermos, con mayor grado de certidumbre para los últimos. De acuerdo a este valor se registraron cuatro estados posibles:

**Verdaderos positivos (VP)**, los enfermos que resultaron positivos a la prueba de la ADA, esto es, enfermos correctamente clasificados por la prueba.

**Falsos Positivos (FP)**, los sanos que dieron respuesta positiva, es decir, individuos sanos incorrectamente clasificados.

**Verdaderos Negativos (VN)**, los sanos que resultaron negativos a la prueba y por tanto, correctamente clasificados

**Falsos Negativos (FN)**, los enfermos que dieron respuesta negativa, y por tanto incorrectamente clasificados.

Y se consideraron cuatro medidas: la sensibilidad, la especificidad, la eficiencia y el valor predictivo:

**Sensibilidad (S)**.- Definida como la capacidad de detectar a los verdaderos enfermos. Se calcula mediante la expresión:  $S = 100 (VP) / (VP + FN)$

**Especificidad (Esp.)**.- Definida como la capacidad de la prueba de discriminar claramente los sanos de los enfermos. Se calcula mediante la expresión:  $Esp = 100 (VN) / (VN + FP)$

**Eficiencia (Efic)**.- O exactitud de la prueba, denota la proporción de enfermos y sanos correctamente clasificados, y está expresada así:  $Efic = (VP + VN) / (\text{Número total de casos})$ .

**Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN)**.- Los valores predictivos positivo y negativo de la ADA sérica, esto es, respectivamente la proporción de los positivos que están realmente enfermos y la de los negativos que están realmente sanos, fueron calculados aplicando la fórmula de Bayes (12) con valores hipotéticos de prevalencia de tuberculosis pulmonar :

$$VPP = \text{Prevalencia} \times \text{Sensibilidad} / (\text{Prevalencia} \times \text{Sensibilidad} + (1 - \text{Prevalencia}) (1 - \text{Especificidad}))$$

$$VPN = (1 - \text{Prevalencia}) \text{Especificidad} / ((1 - \text{Prevalencia}) \text{Especificidad} + \text{Prevalencia} (1 - \text{Sensibilidad}))$$

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos de las determinaciones de la actividad de la enzima adenosina deaminasa (ADA) en suero de individuos normales, tanto hombres como para mujeres. Se puede apreciar que no existe diferencia en el promedio de ambos grupos en cuanto al sexo.

En el Cuadro 2 se presentan los valores obtenidos de los datos agrupados en sanos y enfermos, y se puede apreciar que hay diferencia estadística significativa ( $p < 0,001$ ) entre el grupo control y el de pacientes. Si  $X_{,95}$  representa un punto crítico por encima del cual está el 5% de los datos normales y es igual a 29,2 U/L, la distribución bidimensional de frecuencias de valores según este punto crítico se presenta en el Cuadro 3. De los datos de este cuadro de contingencias resultan los valores estimados de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y eficiencia de la prueba del parámetro estudiado, que se presentan en el Cuadro 4.

Como los valores predictivos de la prueba dependen de la prevalencia de la enfermedad, en el Cuadro 5 se presentan los Valores Predictivos Positivos y Negativos calculados para algunos valores de prevalencia.

## DISCUSIÓN

*Mycobacterium tuberculosis* invade el parénquima pulmonar, donde los antígenos proteicos del bacilo inducen una reacción de hipersensibilidad retardada que estimula a los

linfocitos a activar a los macrófagos contra la micobacteria, y alteran a los macrófagos de los vasos sanguíneos influyendo la formación de granulomas (7).

Se han observado posibles correlaciones entre los niveles altos de adenosina deaminasa en el suero de pacientes tuberculosos con el número total de linfocitos T o las diferencias subpoblaciones de linfocitos (6, 13,14,15). La actividad de la ADA es proporcionada principalmente por dos isoenzimas, ADA-1 y ADA-2, en donde la ADA-2 se encuentra únicamente en los macrófagos, que la liberan cuando son estimulados por la presencia de microorganismos dentro de ellos, incrementando de este modo el contenido de ADA de los fluidos corporales (16).

La adenosina deaminasa se ha considerado como un indicador de la inmunidad mediada por células y los linfocitos T, que juegan un rol importante en la respuesta inmune a la tuberculosis (6)

Se han efectuado muchos trabajos sobre la utilidad de la ADA para el diagnóstico de tuberculosis en líquido pleural y otros fluidos orgánicos (líquido ascítico, líquido pericárdico, LCR) (17,18,19,20) siendo muy escasos los trabajos destinados a demostrar la actividad de la ADA en suero de pacientes sintomáticos respiratorios o con tuberculosis pulmonar activa.

Al estudiar la actividad sérica de la enzima adenosina -deaminasa (ADA) en un grupo de pacientes tuberculosos y compararla con un grupo de personas sin tuberculosis (grupo control negativo), hemos encontrado niveles de ADA sérica significativamente elevados en

el primer grupo respecto del grupo considerado como control, observándose índices de sensibilidad (100%), especificidad (91,11%), eficiencia (94,59%), valor predictivo positivo (87,88%) y valor predictivo negativo (100%), comparables con valores obtenidos por investigadores como Lakshimi, Rao y Toshi que en 1992 en la India obtuvieron índices de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de el Test de 71%, 87%, 90% y 66,5% respectivamente y concluyeron que los valores de la ADA sérica son suficientemente útiles en la identificación de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (5).

No obstante, significativEa actividad sérica de la ADA ha sido observada en entidades clínicas distintas a la tuberculosis: tumores malignos, linfomas, procesos paraneumónicos, empiemas, fiebre tifoidea, otras enfermedades febriles de origen gastrointestinal, hepatitis y enfermedades virales varias. En estos casos la ADA sérica elevada se debe a los grandes números de células polimorfonucleares, y en otros, a la proliferación de linfocitos relativamente indiferenciados (4,20,21).

Ya que la sensibilidad y la especificidad dependen de la prevalencia, de la condición blanco en la población objetivo, los resultados obtenidos en este trabajo para estos parámetros diagnósticos de calidad y para los valores predictivos positivo y negativo de éstos, pueden únicamente generalizarse para regiones en las que la prevalencia de tuberculosis pulmonar entre los pacientes es similar a la de los valores considerados por nosotros. En la medida en que la prevalencia de TBC

disminuye, el valor predictivo positivo (VPP) de la ADA sérica sigue la misma tendencia (Cuadro N° 5).

Si se tiene en cuenta que en el nivel de ADA en suero es dependientes del estado funcional de la inmunidad celular-es un indicador de la inmunidad mediada por células- resulta comprensible que en estas condiciones un determinación aislada de la enzima es de escaso valor diagnóstico, esencialmente cuando se sospecha de enfermedades que comprometen la inmunidad celular, esto hace necesario que toda determinación de la enzima para destacar tuberculosis pulmonar tenga que acompañarse de la orientación de un estudio clínico del paciente sospechoso.

Sin embargo, queda claro que para las regiones en que la prevalencia de tuberculosis pulmonar es tan alta como la nuestra, la determinación de la ADA sérica resulta ser una prueba simple de gran valor diagnóstico.

La técnica original de Giusti es un método desarrollado de punto final, que emplea la reacción de Berthelot para analizar el amoníaco liberado. La sencillez de la técnica, de los materiales, de equipos y reactivos y la experiencia adquirida en el transcurso del desarrollo del trabajo permite concluir que el test de ADA es un test bioquímico de diagnóstico rápido en la detección de tuberculosis pulmonar, de fácil implementación en el laboratorio de rutina y principalmente de bajo costo.

**Cuadro 1.** Valores medios séricos de ADA(U/L)

	Hombres	Mujeres	p
Control			
N	23	22	
Media	19,92	17,70	ns
DS	7,22	4,72	
ES	1,51	1,01	
Pacientes			
N	15	14	
Media	46,98	48,98	ns
DS	6,21	5,92	
ES	1,60	1,58	

**Cuadro 2.** Valores medios séricos de ADA en sanos y enfermos(U/L)

Estadísticos	Sanos	Enfermos	p
N	45	29	
Media	18,84	47,89	< 0,001
DS	6,16	6,05	
ES	1,26	1,59	
X <sub>95</sub>	29,2		

X<sub>95</sub> : Punto crítico

**Cuadro 3.** Frecuencia de valores de ADA según punto crítico

Respuesta ADA	Sanos	Enfermos
Positiva	4	29
Negativa	41	0

**Cuadro 4.** Valoración de la prueba ADA como diagnóstico de TBC

Parámetros	%
Sensibilidad	100,00
Especificidad	91,11
Valor Predictivo Positivo	87,88
Valor Predictivo Negativo	100,00
Eficiencia	94,59

**Cuadro 5.** Influencia de la Prevalencia de Tuberculosis Pulmonar sobre los Valores predictivos Positivos y Negativos del ADA para el Diagnóstico de esta condición.

Prevalencia %	Valor Predictivo Positivo, %	Valor Predictivo Negativo, %
1	10,2	100
2	18,7	100
5	32,7	100
10	65	100
15	74	100
20	79	100

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ministerio de Salud (MINSA).1997.** Situación del Control de la tuberculosis en el Perú. Programa de Control de Tuberculosis. Lima.
2. **Gakis C., Calia GM.1992.** Determination of adenosine deaminase activity in pleural effusion correct interpretation of results. *Rev. Mal.Respir.* Vol N° 9: 649 – 50.
3. **Giusti G. 1974.** Adenosine deaminase. *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol. 2. Pag: 1092 – 9. New York. Academic Press.
4. **Galanti B., Nardiello S. et al. 1981.** Increased lymphocyte adenosine deaminase in Typhoid fever. *Scand J. Infection.* Vol N° 13: 47 – 50.
5. **Lakshmi V., Rao R.R., Joshi N., Rao PN. 1992.** Serum adenosine deaminase activity in bacillary or paucibacillary pulmonary tuberculosis. *Indian J. Pathol Microbiol,* Vol N° 35(1): 48 – 52, 1992.
6. **Mishida Y. Okudairak T., et al. 1980.** The differences in purine metabolism between T and B lymphocytes. *Exp. Haematology* Vol N° 8: 593 – 8.
7. **Abdolghader M., Le Frock J.L. 1982.** Meningitis Tuberculosa. *Clínicas Médicas de Norteamérica,* Vol N° 2: 239 – 235.
8. **Malan C., Donal T., Golden M., Toljaord J. 1984.** Adenosine deaminase levels in cerebrospinal fluid in the diagnosis of tuberculous meningitis. *J. Trop Med Hyg,* Vol N° 87:33 – 40.
9. **Nagarafa M., Ashokan P., Hande M. 1992.** Adenosina deaminasa en derrame pleural. *J. Assoc. Physicians India.* Vol N° 41(3): 157 – 9.
10. **Ocaña I., Martínez-Vásquez M. Segura M, et al.1983.** Adenosine deaminase in Pleural fluids. Test for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* Vol N° 84: 51 – 3.
11. **Tietz N. 1980.** Química Clínica Moderna. Pag: 756-758, México DF. Nueva Editorial Interamericana.
12. **Toman K.1992.** Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de Test diagnósticos. *Boletín de la Unión Internacional de lucha contra la tuberculosis,* Vol N° 56: 18 – 28.
13. **Da Cunha, JG. 1991.** Adenosine deaminase. A pluridisciplinary enzyme. *Acta. Med. Port,* Vol N° 4 : 315 – 23.

14. **Shore A., Dosh M, Gelfand W. 1981.** Role of Adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. *Clin, Exp. Immunol*, Vol N° 44: 152 – 5.
15. **Sullivan J., Osborne W. 1984.** Adenosine Deaminase activity in lymphocytes. *Br. J Haematol*; Vol N° 37: 157 – 8.
16. **Ungerer Jp, Ooshuizen Hm; Bissbort SH; Vermaak WJ. 1992.** Adenosina deaminasa Sérica: Isoenzimas y aplicación diagnóstica. *Sud-Africa Clin Chem*, Vol N° 38(7): 1322 – 6.
17. **Casas J. 1990.** Adenosina deaminasa (ADA) en líquido pleural en el diagnóstico rápido de tuberculosis pleural. *VI Jornadas Científicas*, WPCCH. Lima.
18. **Crisanto M.1992.** Test de Adenosina deaminasa para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes con derrame pleural. Tesis para optar el título de laboratorista clínico. Lima.
19. **Malpartida J. 1993.** Adenosina deaminasa en LCR y peritoneal para el diagnóstico de tuberculosis. Trabajo de aptitud profesional para optar el Bachillerato en Medicina UPCH. FMAH. Lima.
20. **Valdez L., San José E. Alvarez D. 1993.** Diagnóstico de pleuresía tuberculosa usando los parámetros biológicos Adenosina deaminasa, lisozia e interferón Gamma. *Chets*, Vol 103: N°2. Febrero.
21. **Thompon L.F., Seguller J.E. 1985** Adenosine deaminase deficiency and reserve combined immunodeficiency disease. *Advances in enzymology*, Vol N°51: 167-210.