

## DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

### INTRODUCCIÓN

La estandarización de las técnicas resulta esencial para el buen funcionamiento de una red de laboratorios coordinada y de apoyo a un programa de control de la tuberculosis. En nuestro país es difícil concebir los procedimientos bacteriológicos separados de la existencia de un programa, el cual utiliza las técnicas y norma su uso de acuerdo a la situación epidemiológica y de recursos existentes en Chile.

El objetivo de este manual es disponer de un elemento de apoyo en el desarrollo de los procedimientos técnicos y así mantener su pureza.

Este manual será de utilidad, pero en ningún caso reemplazará a una capacitación técnica sobre diagnóstico y control de la tuberculosis.

La enfermedad tuberculosa es producida por el *Mycobacterium tuberculosis*, especie perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales* y género *Mycobacterium*. Las micobacterias, nombre común de la bacteria incluida en este género, han sido consideradas tradicionalmente diferentes al resto de las bacterias, debido a su estructura particular y composición química de la pared.

Este género además incluye más de cien especies, las que se han agrupado según su patogenicidad y también con fines didácticos.

Complejo tuberculosis:

*M. tuberculosis*

*M. bovis* (incluida cepa BCG)

*M. africanum*

*M. microti*

*M. Canetti*

Complejo leprae:

*M. leprae-murinum*

*M. leprae*

Micobacterias no tuberculosas

Oportunistas:

*M. avium*

*M. intracellulare*

*M. kansasii*

*M. scrofulaceum*

Otras

Saprófitas:

*M. gordonae*

*M. terrae*

*M. triviale*

Otras

Morfológicamente son bacilos o cocobacilos ligeramente curvados o rectos, no forman esporas, no presentan flagelos ni cápsula. Son ácido alcohol resistentes (presentan resistencia frente a la decoloración de ácido clorhídrico al 3%) por este motivo se les identifica como bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) también se les considera como gram positivo, aunque no se tiñen totalmente bien con esta coloración.

Las especies pertenecientes a este género se consideran aerobios estrictos y su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. Las formas saprófitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan bien a 22 °C, producen más pigmento y son menos ácido resistentes que las formas patógenas.

La pared celular es la estructura más estudiada de estos microorganismos, por su complejidad y gran contenido lipídico.

Las micobacterias pueden existir en el aire, suelo, agua, los alimentos y en varias clases de animales, donde pueden constituir un peligro potencial para el hombre.

El *complejo tuberculosis* y el *complejo leprae* son las especies más virulentas para el hombre y algunos animales, constituyen en algunos países, particularmente los menos desarrollados, un importante problema de salud pública. En nuestro país la tuberculosis representa una de las primeras causas de muerte entre las enfermedades infecto-contagiosas y la incidencia actualmente es alrededor de 13 casos por 100.000 habitantes.

Las micobacterias no tuberculosas son menos virulentas que el *M. tuberculosis* y los factores dependientes del huésped son determinantes. La transmisión de hombre a hombre no está documentada, por lo tanto esta vía sería de excepción.

## **MUESTRAS**

Una buena muestra es aquella que proviene del sitio de la lesión, en cantidad suficiente, recolectada en un envase adecuado y conservada correctamente.

Es responsabilidad del personal de enfermería o del personal del laboratorio, dependiendo de la organización del servicio, dar las indicaciones al paciente para la recolección de todas aquellas muestras de obtención espontánea. Estas indicaciones se refieren al momento en que debe tomarse la muestra, cómo debe obtenerse, qué volumen es el adecuado, en qué envase debe depositarse y cómo debe rotularse.

En general, en el área de micobacterias no se considera el rechazo de las muestras, aún cuando éstas no sean de buena calidad (saliva) ya que aún en saliva es posible el hallazgo de positividad. Motivo de rechazo es cuando la muestra se recibe:

- En envase sin rotular
- Derramada
- Con evidencias de descomposición

De acuerdo a las diversas localizaciones de la tuberculosis, el laboratorio puede recibir las siguientes muestras:

### **LOCALIZACIÓN PULMONAR:**

- Expectorcación espontánea: considerada la muestra ideal por su buen rendimiento. En nuestro medio se recomienda tomar dos muestras para diagnóstico: una inmediata en el momento de la consulta y la otra matinal al día siguiente, solicitándose un mínimo de 2 ml por muestra. La toma de muestra debe realizarse en un espacio ventilado, en forma individual, para evitar contaminación con los aerosoles que se producen en el momento de toser.

- Expectorcación inducida: en pacientes que no pueden producir una muestra espontánea o en niños, se puede inducir la expectorcación por maniobras kinésicas o por nebulización laríngea.

- Secreción broncoalveolar o lavado broncoalveolar: esta muestra se obtiene a través del procedimiento médico de fibrobroncoscopía; estas muestras, que tienen indicación de cultivo, deben procesarse precozmente, antes de las 4 horas. Los anestésicos empleados en la broncoscopía disminuyen la viabilidad del bacilo y pueden producir un retardo en el desarrollo o un cultivo falso negativo.

- Contenido gástrico: destinado preferentemente a la investigación de tuberculosis pulmonar en niños. La indicación es la extracción de contenido gástrico después de un ayuno de 12 horas. Es una muestra que no se recomienda usar en controles de tratamiento, ya que su rendimiento es prácticamente nulo. Debe procesarse para el cultivo en un plazo máximo de 4 horas para evitar el deterioro de la viabilidad por el pH ácido de esta muestra.

- Todas las muestras de localización pulmonar se conservan en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento y en las muestras de expectoración hasta un máximo de 5 días protegida de la luz.

#### **LOCALIZACIÓN RENAL:**

- Orina: obtención en forma espontánea. En este caso se recomienda procesar 6 muestras matinales recolectadas en días sucesivos, después de un aseo genital prolijo, de segundo chorro y en un volumen no inferior a 50 ml.

- Orina: obtenidas por procedimientos de cateterismo y post masaje prostático, se recomienda que éstas se recolecten en envase estéril.

Las muestras de origen renal deben ser procesadas antes de las 4 horas para evitar la contaminación por flora asociada y cambio de pH. Su conservación es a 4° C hasta su procesamiento.

#### **LOCALIZACIÓN GENITAL:**

- Biopsia de endometrio, trompa, epidídimo u otro tejido: debe ser incluida en agua destilada o suero fisiológico estéril, en el mínimo volumen necesario para mantenerla hidratada. **No debe usarse formalina.**

- Sangre menstrual: no es una muestra recomendada para investigación de tuberculosis, ya que su rendimiento es bajo y su procesamiento es laborioso en el ajuste de pH.

Se recomienda procesar estas muestras antes de las 4 horas de su obtención y conservarlas a 4°C si es necesario.

#### **LOCALIZACIÓN PLEURAL:**

- Líquido pleural: puede usarse un anticoagulante (por ejemplo EDTA) cantidad de muestra recomendada 20 ml ó más.

- Biopsia pleural: su recolección es semejante a la de otros tejidos. Se sugiere procesar estas muestras antes de las 4 horas de su obtención y conservarlas a 4°C si es necesario.

#### **LOCALIZACIÓN MENÍNGEA:**

- Líquido cefalorraquídeo: mantener las condiciones de asepsia de la toma de muestra, procesarla ante de las 4 horas por su escaso contenido bacilar y mantenerla a 4° C si es necesario.

#### **LOCALIZACIÓN GANGLIONAR:**

- Biopsia de ganglio: debe ser incluida en agua destilada o suero fisiológico estéril, en el mínimo volumen necesario para mantenerla hidratada. **No debe usarse formalina.**

- Contenido ganglionar: estas muestras deben procesarse antes de las 4 horas por su escaso contenido bacilar y mantenerse a 4° C si es necesario.

#### **LOCALIZACIÓN OSTEOARTICULAR:**

- Tejido óseo: debe ser incluido en agua destilada o suero fisiológico estéril, en el mínimo volumen necesario para mantenerla hidratado. **No debe usarse formalina.**

- Líquido articular: cantidad recomendada sobre 2 ml. Estas muestras deben procesarse antes de las 4 horas por su escaso contenido bacilar y mantenerse a 4° C si es necesario.

#### **LOCALIZACIÓN INTESTINAL:**

El laboratorio no hace rutinariamente investigación de tuberculosis en deposiciones, la baciloscopía no es confiable, ya que la presencia de BAAR puede deberse a *M. tuberculosis* de procedencia pulmonar (por deglución de la expectoración) o a micobacterias no tuberculosas por la presencia de éstas en los alimentos. Además el cultivo se contamina en una alta proporción debido a la existencia de gran cantidad de flora asociada.

#### **TRANSPORTE DE LA MUESTRA:**

Refiérase anexo bioseguridad en tuberculosis y norma técnica de transporte de muestras ISP 2008

#### **RECEPCIÓN DE MUESTRAS:**

En la recepción de muestras debe verificarse que la identificación del paciente sea coincidente entre el formulario de petición de examen y la rotulación del envase de la muestra.

Para las indicaciones de bioseguridad refiérase a manual de Bioseguridad en tuberculosis

#### **DERIVACIÓN DE CEPAS AL LABORATORIO DE REFERENCIA:**

Para la derivación de cepas debe utilizarse el “Formulario derivación de cepas” actualizado 2010 que se encuentra en la pagina Web del ISP, y realizarse de acuerdo a norma técnica de transporte de sustancias infecciosas del ISP.

Es importante destacar que el envío de las cepas para los estudios de sensibilidad debe hacerse en un tiempo no superior a los 15 días siguientes de su lectura en el laboratorio, esto debido a la pérdida de viabilidad de las cepas a medida que avanzan los días.

## **BACILOSCOPIA: TÉCNICA ZIEHL NIELSEN**

La baciloscopía consiste en la observación microscópica de una muestra teñida con colorantes específicos para micobacterias. Es una técnica rápida, de bajo costo y buena especificidad en nuestro medio.

### **REACTIVOS:**

#### **1.- Fucsina fenicada:**

- Fucsina básica	10 g
- Alcohol de 95°	100 ml
- Fenol acuoso*	55 ml
- Agua destilada	1000 ml

- Se disuelven los 10 gramos de fucsina en los 100 ml de alcohol de 95 °
- A 500 ml de agua destilada caliente (70° C) se le agregan 55 ml de fenol acuoso (agua fenicada).
- La fucsina disuelta en el alcohol se vacía a una probeta o matraz aforado y se le agrega el agua fenicada en pequeñas cantidades, completando a 1000 ml con agua destilada.
- Se deja en reposo y protegida de la luz durante 24 hrs. a 37° C, se envasa y rotula con fecha de preparación fecha de vencimiento y responsable.

Este reactivo se aconseja usarlo hasta **un mes** de preparado, por cristalización de la fucsina. No se debe filtrar más de dos veces para no disminuir la concentración del colorante. Debe guardarse en frasco ámbar. Se sugiere la incorporación de perlas de vidrio de aprox. 3mm a la botella haciendo una capa en el fondo que contribuiría a disminuir la precipitación del colorante.

\* El **fenol acuoso** se prepara calentando a baño María (máximo 70° C) 1 kg de fenol cristalizado hasta su completa disolución y agregando 100 ml de agua destilada. Se

mantiene en frasco oscuro y a temperatura ambiente. Este debe manipularse con las precauciones de acuerdo a

## **2.- Azul de metileno:**

- Azul de metileno                    1 g
- Alcohol 90°                        20 ml
- Acido acético glacial            50 ml
- Agua destilada                    1000 ml

- Al azul de metileno se le agrega el alcohol ácido acético glacial en pequeñas cantidades. Se disuelve por agitación y se completa a 1000 ml con agua destilada. Luego se filtra.

## **3.- Solución decolorante:**

- Ácido clorhídrico (37%)    30 ml
- Alcohol de 95°                970 ml

- Se deja escurrir el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene alcohol; con una pipeta se agita suavemente.

## **4.- Alcohol Eter:**

- Eter                                10 ml
- Alcohol de 95°                20 ml

- Se prepara una solución de alcohol - éter mezclando una parte de éter y 2 de alcohol.

## **MATERIAL DE VIDRIO Y DE LABORATORIO:**

Portaobjetos  
Lápiz marcador indeleble  
Aplicadores de madera o cualquier otro elemento desechable  
Mechero Bunsen  
Papel absorbente  
Desinfectante  
Gradillas  
Frascos para colorantes  
Microscopio

Área de trabajo delimitada e independiente, ideal contar con cabina de bioseguridad que cuente con extractor de aire con filtro.

## **PREPARACIÓN DEL FROTIS:**

### **1.- Muestras mucosas:**

- Elegir la porción más purulenta de la muestra y colocarla sobre un portaobjetos ya identificado.
- Con otro portaobjetos presionar la muestra, extendiéndola mediante batido cuidadoso y lento, alternando éste con el calor suave del mechero, hasta obtener una película homogénea en 2/3 del portaobjetos.

### **2.- Muestras líquidas:**

Las muestras líquidas se deben centrifugar cuando se dispone de un volumen superior a 2 ml. En orina, se recomienda centrifugar un volumen mínimo de 50 ml.

- Centrifugar a 3000 rpm por 30 minutos.
- Colocar una o dos gotas del sedimento sobre un portaobjetos previamente delimitado con un círculo marcado con lápiz indeleble. Secar a 37° C o a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

### **3.- Muestras sólidas:**

- Macerar el tejido en un mortero estéril; si es necesario, ayudarse con un poco de arena fina estéril.
- Agregar una pequeña cantidad de agua destilada estéril o suero fisiológico.
- Colocar una o dos gotas, libre de arena, con una pipeta sobre un portaobjetos delimitado, dejar secar a 37° C o a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

### **FIJACIÓN DE LA MUESTRA:**

1.- Muestras mucosas: en estas muestras la fijación se hace simultáneamente con el extendido, alternando el calor suave del mechero con el batido entre los portaobjetos.

2.- Muestras líquidas o sólidas: se coloca sobre el sedimento una o dos gotas de alcohol - éter, se enciende éste y se deja evaporar completamente.

### **TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN:**

1.- Coloración específica: Se cubre el frotis con fucsina fenicada. Se calienta por debajo de la lámina con un hisopo impregnado de alcohol encendido hasta que se observe la emisión de vapores blancos; retirar la fuente de calor, repetir dos veces más la misma operación; cuidar que el colorante no se derrame, no se seque o hierva. Si esto ocurre, agregar más fucsina a la preparación. El tiempo de contacto con la fucsina debe ser entre 5 y 10 minutos.

2.- Decoloración: decolorar con alcohol ácido alternando con lavados suaves de agua fría (el agua tibia desprende los extendidos). Esta operación se debe repetir las veces que sea necesario hasta que las partes menos espesas queden incoloras.

3.- Coloración de fondo: Se cubren los extendidos con azul de metileno por 30 segundos como mínimo. Se lava con agua corriente suavemente. Se limpia con algodón impregnado en alcohol por debajo de la lámina. Se secan las preparaciones a temperatura ambiente sobre un papel absorbente y limpio.

### **LECTURA:**

La observación microscópica se hace con lente de inmersión y ocular 8 a 10x. Se debe leer un mínimo de cinco zonas que sean representativas del extendido y un mínimo de 100 campos útiles.

Al cambiar la lámina se debe limpiar cuidadosamente el aceite adherido al lente de inmersión, con un papel seco y suave, especialmente si ésta ha sido positiva.

#### **PAUTA DE INFORME:**

- Ausencia de BAAR\*: No se observan BAAR en 100 campos microscópicos.

- BAAR (+): Menos de 1 BAAR promedio por campo en 100 campos observados. Si el total de bacilos observados es menos de diez, dejar registro interno del número encontrado.

- BAAR (++): Uno a diez BAAR promedio por campo en 50 campos observados.

- BAAR (+++): Más de diez BAAR promedio por campo en 20 campos observados.

Cuando sólo se encuentra de 1 a 3 BAAR en el total de campos observados, es necesario extender la lectura a un mayor número de campos hasta agotar las posibilidades de encontrar el cuarto bacilo. Si no es posible confirmar la positividad, se debe:

- Hacer otro extendido de la misma muestra y observar acuciosamente. Si no se encuentran más bacilos, se informa negativa y si es posible se hace cultivo.

- Solicitar una nueva muestra.

La exigencia de informar positivo con la presencia de mínimo 4 bacilos ó más, corresponde a la norma convencional de OPS, que señala que existe la posibilidad de encontrar elementos figurados (precipitados de fucsina, alimentos, partículas de ceras) que puedan inducir a falsos diagnósticos.

#### **BIOSEGURIDAD EN LA BACILOSCOPIA:**

Es importante señalar que en esta técnica la etapa de mayor riesgo por la producción de aerosoles es el extendido por el sistema de batido, por lo tanto es indispensable que se cumplan todas las medidas de bioseguridad señaladas en el documento de bioseguridad para laboratorios de tuberculosis.

#### **CULTIVO: TÉCNICA DE PETROFF MODIFICADA**

Las normas de utilización del cultivo están dirigidas fundamentalmente a aquellas muestras en las que se sospecha una escasa población bacilar, como aquellas que provienen de estudios de contactos, imágenes radiológicas patológicas pulmonares, pediátricas y en muestras de procedencia extrapulmonar.

El cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* es una técnica que requiere mayor tiempo, equipamiento y costo que la baciloscopía, pero ofrece una mayor sensibilidad y buena especificidad.

#### **MATERIAL DE VIDRIO Y LABORATORIO:**

Área de trabajo delimitada e independiente, ideal contar con gabinete de bioseguridad.

- Lápiz marcador indeleble
- Mechero
- Papel absorbente
- Desinfectante
- Gradillas
- Pipetas Pasteur
- Propipetas o chupetes de goma
- Frascos para reactivos:
- Tubos de vidrio 18 x 100 a 120mm con fondo redondo reforzado.
- Papel pH (5-8)
- Agitador mecánico horizontal
- Tubos con medio de cultivo Loewenstein-Jensen
- Cajas de madera con fondo inclinado
- Plástico de 0.4 mm de espesor y elásticos, en caso necesario.
- Estufa de cultivo 36 ° C.  $\pm$  1°C

#### **PROCEDIMIENTO:**

- Si la muestra es de origen pulmonar se debe elegir la porción más purulenta, se vacía directamente a un tubo de 18 x 100 mm un volumen de

aproximadamente 2 ml de muestra con una pipeta pasteur con algodón en un extremo y chupete o propipeta para trasvasar la muestra.

- Si la muestra es líquida y el volumen lo justifica (mínimo 2 ml), se debe centrifugar a 3.000 r.p.m. por 30 minutos. El sedimento se suspende en un máximo de 2 ml de la misma muestra y se vacía a un tubo de 18 x 100 mm.

- Si la muestra es tejido o coágulo debe triturarse en un mortero estéril y si es necesario, con arena igualmente estéril. Luego se agrega agua destilada para arrastrar la muestra a un tubo de 18 x 100 mm, en cantidad de 2 ml de muestra.

#### **REACTIVOS:**

1.- Hidróxido de sodio al 3,5%

- NaOH 35 g
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml

2.- Hidróxido de sodio al 2%:

- NaOH 2 g
- Agua destilada c.s.p. 100 ml
- Autoclavar y conservar estéril

3.- Ácido sulfúrico al 7% + tornasol

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70 ml
- Agua destilada 930 ml
- Tornasol 10% 6 ml

4.- Preparación del tornasol al 10%:

- Tornasol p.a. 10 g
- Agua destilada c.s.p 100 ml

Disolver en autoclave a 120° C por 20 minutos. De esta solución tornasol al 10% se agrega 6 ml a 1 lt de ácido sulfúrico al 7% en frío.

#### **Descontaminación y Neutralización:**

- Se agrega a cada tubo un volumen igual al de la muestra de hidróxido de sodio [NaOH] al 3.5%.

- Se agita en forma mecánica a 37° C por 20 minutos. Si no se dispone de agitador mecánico, se dejan los tubos a 37° C durante 30 minutos y se agita manualmente dos o 3 veces.

- A los 20 ó 30 minutos según el caso, se le agrega gota a gota, ácido sulfúrico [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] al 7% más tornasol, hasta que se produzca viraje de color (de azul a rosa).

- Luego se agrega gota a gota NaOH al 3.5% y para ajustar fino con NaOH al 2% hasta el punto de viraje (rosa a lila) dejándola finalmente a pH 6.6 - 7.2.

Se recomienda:

- Efectuar la neutralización inmediatamente después de terminada la etapa de agitación con el NaOH al 3.5%.

- Trabajar en serie las muestras en número que permitan respetar los tiempos establecidos para cada etapa.

- Controlar el pH con papel indicador, especialmente en muestras muy purulentas, con color propio (sangre, orina) o cuando hay poca experiencia en la técnica.

- Esperar 5 a 10 minutos y tomar pH al azar a 2 ó 3 muestras de la serie.

### **Siembra e Incubación:**

- Sembrar 0.3 a 0.5 ml en cada tubo de medio a utilizar por cada muestra. La siembra se hace en general en 3 tubos de medio L. Jensen y en las muestras de orina y en otras especiales se recomienda sembrar 6 tubos.

- Los tubos se incuban en posición horizontal inclinada, de manera que la siembra bañe la superficie del medio.

- Dejar por 48 - 72 horas en la estufa a 37° C para la evaporación del líquido de siembra.

- Quemar los tapones de algodón, si fuera el caso, e introducirlos al tubo a más o menos 1 cm del borde.

- Tapar los tubos con plástico de 0.4 mm de espesor, el que se ajusta con elástico al borde del tubo.

- Si los tubos con medio tienen tapa rosca, en esta etapa dejarla ligeramente suelta para permitir la evaporación. Luego ajustar la tapa. Incubar nuevamente los cultivos en posición horizontal inclinada a 37°.

### **Revisión de los cultivos:**

- La primera observación se hace a las 48 - 72 horas. Esto permite detectar contaminación por flora asociada. Si esta alteración se presenta en todos los tubos sembrados se solicita nueva muestra.

- La segunda revisión se hace a los 30 días, fecha en que se informará todo lo positivo y la contaminación tardía.

- A los 60 días se hace la última revisión y el informe definitivo, ya sea negativo o positivo.

### **Informe semi-cuantitativo:**

El informe se hace basándose en la suma de los recuentos de las colonias desarrolladas en todos los tubos sembrados. Las colonias típicas de *M. tuberculosis* son secas, rugosas y con una leve coloración marfil.

- De 1 a 50 colonias : Se informa el número exacto de colonias desarrolladas.

- Colonias no confluentes : Más de 50 colonias.

- Colonias confluentes : Incontables colonias.

- Ausencia de colonias : Se informa negativo.

- Contaminados todos los tubos : Se informa muestra contaminada, enviar nueva muestra.

- Colonias anormales en morfología o pigmentación: Se efectúa frotis de una colonia para confirmar la presencia de BAAR y si es positivo se informa: "cultivo positivo para micobacterias", el número de colonias y se agrega "por morfología o pigmentación anormal (según corresponda) se confirmará por identificación en el ISP".

## **MEDIO DE CULTIVO**

En la técnica diagnóstica de cultivo es indispensable contar con un medio que contenga los nutrientes adecuados a las exigencias del *M. tuberculosis*.

El medio Loewenstein Jensen, sin ser el ideal, es el que reúne más condiciones para usarlo en forma masiva en países como el nuestro, donde existe una red de laboratorios de la especialidad.

Como la composición del Loewenstein Jensen es muy diferente a otros, especialmente su contenido proteico (huevos) no puede esterilizarse al final de su preparación.

### **1.- Requisitos para su preparación:**

1.1.- El local idealmente debe ser independiente, o en su defecto, destinar un lugar donde no haya circulación de personas.

1.2.- Todo el material utilizado debe estar previamente estéril (matraces, tubos, repartidores, etc.).

1.3.- Durante su elaboración se debe trabajar en condiciones asépticas, al lado del mechero.

### **2.- Constituyentes básicos para el medio:**

2.1.- Solución de sales (1 fórmula)

Fosfato monopotásico ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ )	2.4 gr
Sulfato de magnesio ( $\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$ )	0.24 gr

Citrato de magnesio ( $C_{12}H_{10}Mg_3O_{14}7H_2O$ )	0.60 gr ó ( $C_{12}H_{10}Mg_3O_{14}14H_2O$ )	0.935 gr
L-Asparragina		3.6gr
Glicerina bidestilada		12 ml
Agua destilada		*642 ml

\* Se considera pérdida de 5% de volumen a la autoclave.

2.2.- Suspensión de huevos enteros 1000 ml

2.3.- Solución acuosa de verde de malaquita al 2% 20 ml

### 3.- Preparación

3.1.- Pesar todas las sales, la asparragina, agregar la glicerina y el volumen de agua que corresponde.

3.2.- Esterilizarlas al autoclave al 115°C x 20 minutos. Verificar si éstas se mantienen cristalinas al sacarlas de la autoclave. Si se enturbian, hay que eliminarlas, ya que están precipitadas o contaminadas.

3.3.- El verde de malaquita al 2% se puede preparar en el momento de su uso o guardar sellado y estéril por tiempo indefinido (ampollas, tubos, tapa de rosca).

3.4.- Los huevos frescos se lavan con detergente neutro uno a uno y se enjuagan con abundante agua fría corriente; se estilan en un canastillo.

3.5.- Los huevos se homogenizan en una juguera descontando el volumen de espuma.

3.6.- En un matraz se mezclan huevos - sales y verde de malaquita.

3.7.- Se filtra en un embudo con cuatro hojas de gasa hidrófila estéril.

3.8.- Dejar en reposo en un lugar oscuro por una hora para su estabilización (pH) y eliminación de burbujas internas.

3.9.- Luego se reparte en tubos de 18 x 180 mm. 6 a 7 ml de medio, dejando que escurra por las paredes para evitar burbujas.

### 4.- Coagulación:

4.1.- Los tubos se ponen en bandejas o gradillas horizontales inclinadas.

4.2.- Los coaguladores se encienden con anticipación, de manera que al poner las bandejas se haya alcanzado una temperatura cercana a la de coagulación (80°C)

4.3.- Cuando el coagulador alcanza 80°C se comienza a controlar el tiempo de coagulación (una hora) para el total del proceso (temperatura máxima permitida 85°C).

4.4.- Al retirar los tubos del equipo, comprobar la firmeza del medio y dejarlos en posición horizontal, protegidos de la luz, hasta que se enfríen.

#### **5.- Control de esterilidad:**

5.1.- Controlar a 37° C por 48 horas.

#### **6.- Conservación:**

6.1.- A 4°C.

6.2.- A temperatura ambiente, en un lugar fresco y protegido de la luz.

#### **7.- Duración:**

7.1.- Dos meses.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ADENOSINDEAMINASA (ADA) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS.**

### ***Introducción:***

La adenosindeaminasa (ADA) es una enzima derivada del metabolismo de las purinas, cuya cantidad se encuentra elevada en los exudados provenientes de pleuresías, peritonitis y meningitis tuberculosa e incluso en suero de enfermos con tuberculosis activa.

La aplicación más útil de esta técnica es en el diagnóstico de la meningitis tuberculosa y en el diagnóstico diferencial entre pleuresías tuberculosas y neoplásicas, ya que aunque la ADA también está elevada en el líquido pleural de los empiemas, artritis reumatoideas y algunos linfomas, estas últimas condiciones son más fáciles de diferenciar clínicamente.

Esta determinación está al alcance de cualquier centro hospitalario del país, cuyos laboratorios cuenten con un espectrofotómetro. El costo de insumos por examen es bajo.

### **TÉCNICA DE GIUSTI MODIFICADA**

#### ***Obtención de la muestra:***

- Las muestras para el estudio de ADA se obtienen a través de procedimientos especiales, en forma aséptica, condición que debe mantenerse hasta su procesamiento. Se recomienda no trabajar una muestra cuando ésta tiene indicios de hemólisis, la presencia de hemoglobina altera los resultados de la determinación.

#### ***Conservación de la muestra:***

- Se recomienda conservar la muestra a bajas temperaturas (sin congelar) mientras llegan al laboratorio.

- Luego se aconseja centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos, con el fin de retirar posibles glóbulos rojos, fibrina, mucus, etc.

- Si no se trabajan inmediatamente, congelarlas a -20°C hasta su procesamiento.

### ***Transporte de la muestra:***

- Se aconseja transportar la muestra adicionada de una unidad refrigerante y con las medidas de bioseguridad que corresponden al traslado de cualquier muestra potencialmente contaminada.

### ***Reactivos:***

Para la preparación de reactivos debe usarse agua destilada previamente hervida, con el fin de asegurar ausencia de trazas de amonio.

1.- Buffer fosfato:	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	=	4.73 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	=	5.62 g
	Ó con 2H <sub>2</sub> O	=	2.79 g

- Disolver en agua destilada, ajustar a pH 6.5 y enrasar a 1000 ml
- 2.- Solución de adenosina tamponada: Adenosina Merck = 140 mg
  - Disolver en buffer fosfato  $\pm$  15 ml en matraz aforado de 25 ml. Llevar a baño termorregulador a 50° C, enfriar y ajustar a pH 6.5.
  - Envasar en matraz aforado con buffer fosfato a 25 ml
  - Se debe preparar solución fresca cada vez que se hacen las determinaciones.
- 3.- Reactivos de desproteinización:
  - 3.1 Acido sulfúrico = 2/3 N
    - Para un ácido sulfúrico de 97% de pureza se toman 18.3 ml para 1.000 ml de solución.
  - 3.2 Tungstato de sodio al 10%.
    - Pesar 10 g para 100 ml de agua destilada.

#### 4.- Reactivos de coloración

##### 4.1 Fenol nitroprusiato:

Nitroprusiato de sodio	=	0.125 g
Fenol (p.a.) licuado	=	25 ml

- Disolver ambos reactivos en H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. 500 ml
- Guardar en botella ámbar a 4°C
- El reactivo es estable 6 meses.

##### 4.2 Hipoclorito alcalino:

Hidróxido de sodio	= 12.5 g
Hipoclorito de sodio	= 5.25% (cloro puro comercial) = 20ml

- Disolver en agua fría destilada c.s.p. 500 ml.
- Guardar en botella ámbar a 4°C.
- El reactivo es estable por 6 meses.

#### ***Curva de Calibración:***

- La preparación de reactivos nuevos obliga a hacer curva de calibración, especialmente cuando se renueva el buffer fosfato.
- Preparar una solución stock con 0.943 g de sulfato de amonio puro y seco en 100 ml. Se disuelve en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N.
- Tomar 1 ml de esta solución stock y diluirla hasta 250 ml con agua destilada. Se recomienda renovarla una vez al mes.

tubos	Blanco	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7
Sol.Stándar	0.0	0.025	0.050	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7ml
H <sub>2</sub> O destilada	0.7	0.675	0.650	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0ml
Buffer fosfato	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2/3N	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4ml
T Tungstato 10%	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2ml
U unidades ADA/L	0	2.4	4.8	9.5	19.0	28.6	38.1	47.6	57.0	66.5ml

- Mezclar bien y pipetear 2 ml de cada tubo.
- Agregar a cada tubo: 2 ml de fenol nitroprusiato  
2 ml de hipoclorito alcalino
- Mezclar e incubar por 15 minutos para desarrollo de color.
- Medir absorbancia de cada tubo contra el blanco.

Para calcular en forma precisa las unidades de ADA / litro se utiliza el método de la regresión lineal en base a las absorbancias (Y) obtenidas en la curva de calibración y las unidades ADA/L (X) que le corresponden.

Se calcula A; B y r (coeficiente de correlación que debe ser cercano a 1)

$$A = \frac{(\sum y) (\sum x^2) - (\sum x) (\sum xy)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$B = \frac{N \sum yx - \sum y (\sum x)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$r = \frac{N \sum yx - \sum y (\sum x) (\sum x)}{[N \sum x^2 - (\sum x)^2] [N \sum y^2 - (\sum y)^2]}$$



$$[N \sum x^2 - (\sum x)^2] [N \sum y^2 - (\sum y)^2]$$

N = Número de muestras en la curva de calibración (N=9)  
 A = Valor de Y cuando X es cero.  
 r = Coeficiente angular (cambio que experimenta Y por cada unidad X).

A partir de la curva de calibración se calculan matemáticamente por la ecuación de la recta, los valores de unidades de ADA/l de las muestras, despejando X.

$$Y = A + Bx \text{-----} X = 1/B Y - A/B$$

**Técnica:**

Cada vez que se hace alguna determinación se prepara una solución de adenosina en buffer fosfato pH 6.5. Se disuelven 140 mg de adenosina en 25 ml de buffer en baño termorregulado a 50 - 60°C; enfriar, ajustar a pH 6.5 y enrasar a 25 ml con buffer.

<b>Tubo test</b>	<b>Control</b>	<b>blanco</b>	<b>reactivo</b>
Muestra problema	0.4 ml		0.4 ml
Buffer fosfato	4.0 ml		4.0 ml

- Incubar estos tubos a 37°C en baño termorregulado por 5 minutos, junto con la adenosina necesaria para el número de determinaciones (12.5 ml para 6 muestras).

**NOTA:** Se recomienda tapar los tubos con parafilm en la etapa de incubación.

	<b>Control blanco-reactivo</b>	<b>Tubo test</b>
- Tiempo cero		
Adenosina	--	1.0 ml
- Incubar a 37°C exactamente 30 minutos.		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2/3N	0.8 ml	0.8 ml
Adenosina	1.0 ml	--
Tungstato 10%	0.4 ml	0.4 ml

- Mezclar y centrifugar 10 min. A 2.000 r.p.m.

### Control blanco-reactivo Tubo test

Sobrenadante	2.0 ml	2.0 ml
Fenol nitroprusiato	2.0 ml	2.0 ml
Hipoclorito alcalino	2.0 ml	2.0 ml

- Mezclar e incubar a 37°C durante 15 minutos para desarrollo de color.
- Leer a 630 nm la absorbancia del tubo test contra el blanco.

**NOTA:** La muestra y los reactivos preparados se pueden utilizar a la mitad de las cantidades descritas cuando la ésta es escasa.

Si la muestra lo permite se aconseja realizar la determinación en duplicada obteniendo como resultado de lectura un valor promedio.

#### Referencias Bibliográficas:

- 1.- Bacteriología de la tuberculosis. La muestra. El examen microscópico. Organización Panamericana de la Salud. Nota Técnica N° 26, 1984.
- 2.- Bacteriología de la tuberculosis. El cultivo del Mycobacterium tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud. Nota Técnica N° 27, 1985.
- 3.- Manual de Bacteriología de la Tuberculosis. Técnicas y Procedimientos básicos. Organización Panamericana de la salud. 1973.
- 4.- Guía para el Diagnóstico de la Tuberculosis por el examen microscópico. Organización Panamericana de la Salud. Publicación N° 277, 1974.
- 5.- Guisti G. Adenosindeaminasa In. Bergmeyes HU, Ed. Methods of Enzymatic Analysis. New York Academic Press Inc. 1974.
- 6.- Cruz E., Pinto E., Serret H., Pertuzzé y Del Río G., Adenosindeaminasa (ADA) en líquido pleural: valor para la identificación de la etiología tuberculosa. Enf. Resp. Cir. Tórax 3:176, 1987.