

Utilidad de la dosificación de adenosin deaminasa en el diagnóstico de la tuberculosis pleural. Primera experiencia nacional

Dres. Cecilia Coitinho*, Rosario San Martín†, Cristina Mier‡, Roxana Rodríguez§, Silvia Zunino Torres¶, Carlos Rivas††

Departamento de Laboratorio, Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes, Uruguay.

Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina, Uruguay

Resumen

Introducción: *la bacteriología del líquido pleural (LP) para el diagnóstico de la tuberculosis pleural (TBP) es lenta y poco sensible; la biopsia de mejor rendimiento es cruenta y costosa. A pesar de que la dosificación de la adenosin deaminasa (ADA) en el LP se describe como un recurso valioso para el diagnóstico de tuberculosis pleural no existe experiencia en nuestro medio.*

Objetivo: *validar el uso de la dosificación de ADA en líquido pleural para diagnóstico de TBP.*

Material y método: *dosificación de ADA por técnica colorimétrica de Giusti en 113 líquidos pleurales provenientes de 66 pacientes sospechosos de TBP (grupo gTBP) con bacteriología realizada y 47 pacientes con derrames de causa no tuberculosa, (grupo control gC). El valor de corte se estableció en 40 U/l.*

Resultados: *en el grupo gTBP 12 pacientes presentaron ADA mayor a 40 U/l; en ocho se realizó diagnóstico TBP. Para el valor de corte establecido la ADA presentó una sensibilidad de 100%; especificidad de 93%; valor predictivo positivo (VPP): 67%; valor predictivo negativo (VPN): 100%. En el gC (n = 47) cuatro muestras presentaron valores de ADA mayores a 40 U/l (un timoma, un linfoma y dos empiemas).*

Conclusiones: *la ADA en LP es una técnica sensible y específica para la TBP, destacándose su alto VPPN; reduce la necesidad de biopsias y acorta el tiempo diagnóstico; es de fácil ejecución y bajo costo. Existen otras enfermedades que elevan la ADA en el LP que deben considerarse en la interpretación de resultados.*

Palabras clave: *ADENOSINDESAMINASA-administración & dosificación. TUBERCULOSIS PLEURAL- diagnóstico.*

* Especialista en Laboratorio Clínico. Departamento de Laboratorio Bacteriológico. Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes. Montevideo, Uruguay.

† Asistente de Laboratorio Clínico. Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay.

‡ Prof. Adjunto de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay.

§ Residente del Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay.

¶ Prof. Adjunto de Laboratorio Clínico. Departamento de Labora-

torio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay.

†† Prof. Agdo. Jefe de Departamento de Laboratorio Bacteriológico. Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes. Montevideo, Uruguay.

Correspondencia: Dra. Cecilia Coitinho.

Departamento de Laboratorio de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes
Avda. 18 de julio 2175, 6° piso. Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: ccoitinho@yahoo.com

Recibido: 1/2/06.

Aceptado: 18/12/06.

Introducción

La tuberculosis pleural (TBP) es relativamente frecuente⁽¹⁾, estando ligada a la prevalencia de la tuberculosis (TB) de cada región; mientras se observa con frecuencia en los países más pobres, se transforma en una rara entidad clínica en los países desarrollados⁽²⁾.

En Uruguay durante el período 2002-2004 se diagnosticaron 1.977 casos de TB y, dentro de éstos, 159 casos de TBP, constituyendo 8% de la incidencia⁽³⁾. De ellos, 66 fueron confirmados por la bacteriología o por la histología, o ambas, los restantes 93 casos fueron considerados TBP por el diagnóstico clínico-radiológico y por la respuesta frente al tratamiento antituberculoso pese a no ser casos confirmados por estudios bacteriológicos ni histológicos. El Departamento de Laboratorio de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP) recibió en el mismo período 368 muestras de líquidos pleurales (LP) para investigación de TB, obteniendo apenas 2,4% de muestras positivas, fundamentalmente por cultivos, con una demora de dos meses en los resultados⁽⁴⁾. La baja sensibilidad y la demora de la bacteriología, y la inespecificidad de la clínica han llevado a implementar técnicas indirectas que contribuyan a confirmar el diagnóstico presuntivo de la TBP. Se han buscado marcadores que permitan un diagnóstico más rápido y efectivo que la bacteriología, uno de ellos es la enzima adenosin deaminasa (ADA, E.C. 3.5.4.4). La determinación de la actividad de la ADA surge en 1980 y ha demostrado ser de gran rendimiento, fácil ejecución, rápida y de bajo costo, y ha confirmado su gran utilidad para el diagnóstico de la TBP⁽⁵⁻¹⁰⁾.

La ADA es una enzima polimórfica del catabolismo de las purinas que cataliza la desaminación de adenosina y deoxyadenosina para producir inosina y deoxyinosina, respectivamente, liberando amoníaco en el proceso^(5,11,12). Esta enzima se distribuye ampliamente en el organismo humano, encontrándose actividad de ADA en prácticamente todos los tejidos. Sin embargo, su mayor actividad se encuentra en el tejido linfoide, principalmente en los linfocitos T y varía durante la diferenciación de éstos y en la maduración de los macrófagos^(12,13).

Algunos autores consideran a la ADA como un marcador de la inmunidad mediada por células y aunque su actividad puede estar aumentada en empiemas y derrames causados por otras causas como linfomas, enfermedades autoinmunes y lupus eritematoso sistémico (LES), su indicación principal es en el diagnóstico de los derrames tuberculosos⁽¹³⁻¹⁶⁾. Hasta el momento la determinación de la ADA no se realiza en nuestro medio y, por lo tanto, no existe experiencia sobre su utilidad para mejorar y acelerar el diagnóstico de la TBP.

Objetivos

Evaluar el desempeño diagnóstico de la dosificación de ADA por el método de Giusti –utilizado habitualmente a nivel internacional– en líquidos pleurales, como contribución al diagnóstico de TBP para una futura implementación de rutina en nuestro medio.

Material y método

Población: se realizó la dosificación de ADA a 113 muestras de líquidos pleurales que correspondieron a dos grupos de pacientes. El primer grupo (gTBP) lo conformaron 66 enfermos, 45 del sexo masculino y 21 del sexo femenino, con un promedio de edad de 65 años (intervalo 8-104), procedentes de todo el país, sospechosos de tuberculosis pleural cuyas muestras se enviaron al laboratorio de CHLA-EP para la confirmación bacteriológica de TBP. El grupo control (gC), estuvo formado por 47 pacientes, 24 del sexo masculino y 23 del sexo femenino, con un promedio de edad de 53 años (intervalo 19-89), internados en el Hospital de Clínicas con distintos diagnósticos presuntivos excluyendo TBP.

Muestras: todas las muestras extraídas fueron enviadas de inmediato para su procesamiento, a temperatura ambiente y sin conservadores. Para el grupo gTBP, cinco mililitros de líquido pleural se centrifugaron durante 10 minutos a 2.500 rpm.; el sedimento se utilizó para el estudio bacteriológico (directo y cultivo) de tuberculosis y el sobrenadante se almacenó a -20° C para la dosificación de ADA. Para el gC con el sobrenadante se realizó dosificación de glucosa, proteínas, LDH (datos no incluidos) y se almacenó una alícuota a -20° C para dosificación de ADA. El sedimento se utilizó para estudio citológico (tinción con May-Grumwald Giemsa). Líquidos con características de exudados también fueron incluidos.

A todas las muestras se les realizó la dosificación de ADA por el método colorimétrico de Giusti y Galanti⁽¹¹⁾ con modificaciones. Brevemente: 25 µl de líquido pleural se incubaron por 60 minutos a 37° C con 500 µl de una solución de adenosina (5,6 mg/ml) en buffer de fosfatos pH 6,5. La reacción se interrumpió con el agregado de una solución de fenol y nitroprusiato y na solución de hipoclorito. La mezcla se incubó por 10 minutos a 37° C, luego de los cuales se leyó la absorbencia correspondiente al indofenol resultante (liberado por la acción de la ADA), en espectrofotómetro digital a 620 nm de longitud de onda.

Los valores de las lecturas fueron convertidos a U/l (una unidad de ADA corresponde a 3 mmol de amonio liberada en la mezcla de reacción, incubada una hora a 37° C). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado

con un coeficiente de variación aceptado de hasta 7% entre los duplicados. Para el gTBP se determinó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los siguientes valores de corte: 35 U/l, 40 U/l, 50 U/l y 60 U/l. Se consideraron verdaderos positivos los enfermos fichados en el Registro Nacional de Tuberculosis (tuberculosis confirmada o no) de la CHLA-EP (los criterios utilizados por la institución para registrar un caso de tuberculosis se basan en la clínica, radiología, epidemiología y respuesta al tratamiento, luego se dividen en casos confirmados o no confirmados por técnicas de laboratorio). Para el gC se consideró como diagnóstico definitivo el que constaba en la historia clínica. Se aplicó el estadístico chi cuadrado para evaluar la diferencia de proporciones de casos positivos entre ambos grupos.

Resultados

Entre los pacientes pertenecientes al gTBP (n = 66), ocho fueron diagnosticados como tuberculosos según los criterios de CHLA-EP, cinco confirmados por bacteriología/histología y tres no confirmados. El desempeño diagnóstico de la técnica de dosificación de ADA para el gTBP para los valores de corte considerados se muestra en la tabla 1. El punto óptimo de mejor relación sensibilidad, especificidad fue el de 40 U/l (sensibilidad: 100%, especificidad: 93%, valor predictivo negativo: 100%). Para este valor de corte, los valores de ADA negativos fueron de 15 U/l de promedio (intervalo 1-36) y de 95 U/l de promedio (intervalo 49-164) para los ADA positivos (tabla 2). Se observaron cuatro determinaciones mayores a 40 U/l en enfermos no tuberculosos (falsos positivos); la figura 1 muestra las determinaciones obtenidas para el grupo. En el gC (n = 47) los valores de ADA negativos fueron de 11 U/l de promedio (intervalo 1-37); el promedio para los positivos fue de 73 U/l (intervalo 50-98 U/l). Se encontraron cuatro pacientes con valores de ADA mayores a 40 U/l, en el resto del grupo todas las determinaciones fueron

Tabla 2. Actividad de ADA para el grupo gTBP y concordancia con el diagnóstico de TBP

Resultado	Pacientes (n)
ADA(+)	12
ADA(-)	54
ADA(+) TBP(+)	8
ADA(+) TBP(-)	4
ADA(-) TBP(-)	54
ADA(-) TBP(+)	0

Sensibilidad 100%, especificidad 93%, valor predictivo positivo 67%, valor predictivo negativo 100%
 Valor de corte positivo 40 U/l
 TBP(+): enfermos registrados en CHLA – EP como TBP con o sin confirmación bacteriológica/histológica

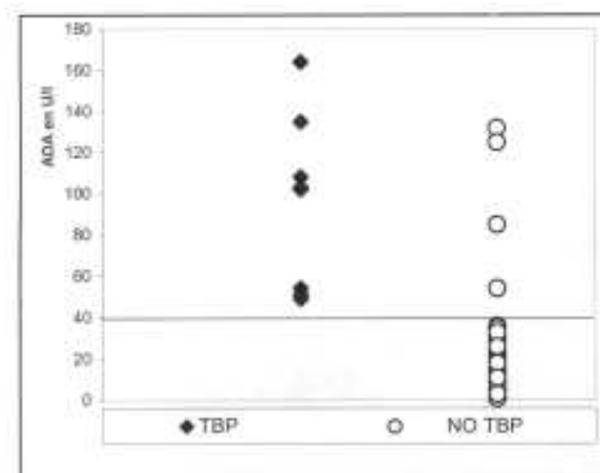


Figura 1. Dispersión para determinaciones de ADA (adenosin de aminasa) en el grupo gTBP (pacientes con sospecha clínica de TBP)

Tabla 1. Desempeño diagnóstico de la técnica de dosificación de ADA para el gTBP según diferentes valores de corte

Valor de corte en U/l	S%	E%	VPP%	VPN%
35	100	91,3	61,5	100
40	100	93,1	66,6	100
50	87,5	93,1	63,6	98,1
60	62,5	94,8	62,5	94,8

S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, ADA: adenosin de aminasa

negativas (figura 2). Las determinaciones positivas para este grupo (tabla 3) corresponden a enfermedades en las cuales la actividad de ADA se encuentra elevada. El análisis de las diferencias de proporciones de casos positivos entre ambos grupos, a través del estadístico chi cuadrado, no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$).

Discusión - Conclusiones

La experiencia internacional ha demostrado sin dudas que la dosificación de ADA como examen de rutina en el líquido pleural es una valiosa ayuda para el diagnóstico de la TBP⁽¹⁷⁻²²⁾, incluyendo pacientes portadores de VIH/SIDA⁽⁶⁾. Nuestros resultados también muestran que la ADA resultó ser mejor que la bacteriología y la histología. En relación con la fijación de los valores de corte, con valores de 40 U/l se obtiene una excelente sensibilidad y especificidad, así como un alto valor predictivo negativo; estas cifras son similares en la región^(6,13). En los dos grupos estudiados existieron pacientes con niveles de ADA superiores a 40 U/l que no tenían una TBP; cuando se pudo obtener el diagnóstico final (gC) se observó que los pacientes no TBP con determinaciones de ADA > 40 U/l eran portadores de enfermedades en las que se reconocen también incrementos de la actividad de la enzima^(7,23,24). También es posible la existencia de falsos positivos debidos a la manipulación inadecuada de las muestras, ya que se ha demostrado que la destrucción de leucocitos libera ADA intracelular⁽¹³⁾. Asimismo –aunque no lo observamos en nuestra experiencia–, también es posible el descenso de la actividad ADA como consecuencia de un

transporte y almacenamiento a temperaturas inadecuadas⁽²⁵⁾. El conocimiento de otras enfermedades que elevan ADA y las condiciones de envío de las muestras son factores que deben ser tenidos en cuenta al momento de la interpretación de los resultados. La ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de positivos de ambos grupos sugiere que este método es útil en poblaciones con diagnóstico presuntivo de TBP. Por tratarse de una técnica sencilla y rápida es posible acortar los tiempos diagnósticos en forma sustancial. Esta ventaja adicional al bajo costo de la ejecución se suma a que pueden evitarse biopsias y otras técnicas invasivas que aumentan el número de complicaciones, so-

Tabla 3. Actividad de ADA para el grupo gC y concordancia con el diagnóstico de otras enfermedades diferentes de TBP

Pacientes (n) = 47	
ADA (+): 4	ADA (-): 43
1 timoma	4 poscirugía cardíaca
1 linfoma	4 insuficiencia cardíaca
2 empiemas	2 causa reumatoidea
	1 TEP
	13 neoplasias
	4 hepatopatías
	15 neumonías agudas

Valor de corte positivo: 40U/l

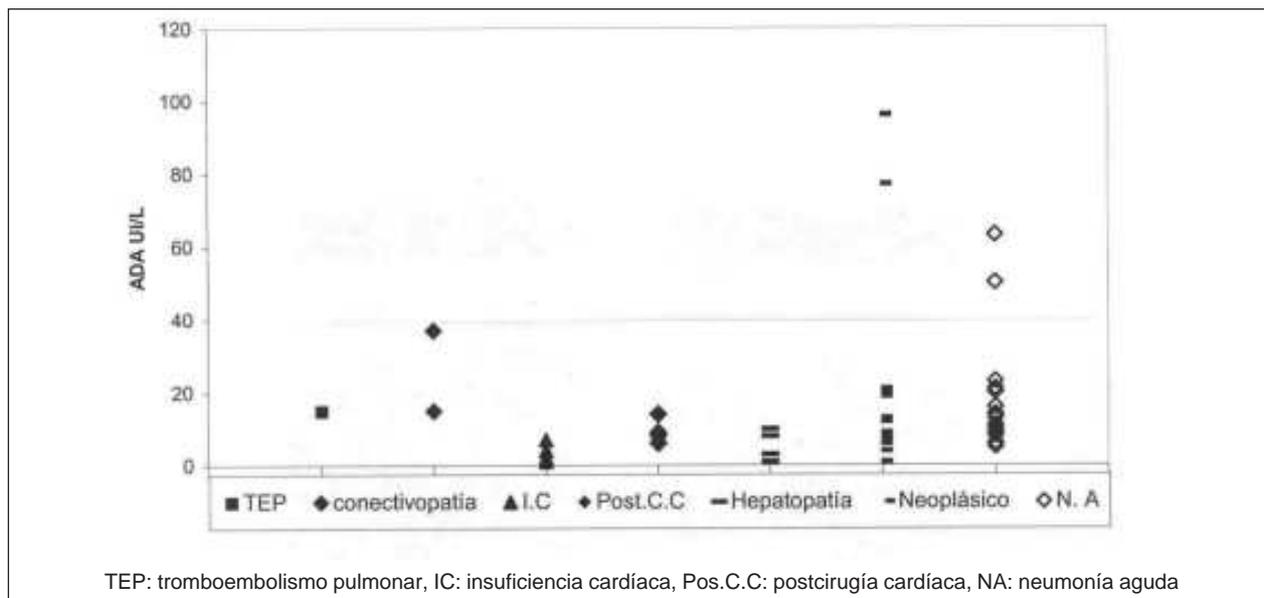


Figura 2. Dispersión para determinaciones de ADA según diagnóstico definitivo en el grupo gC (pacientes sin sospecha clínica de TBP)

bre todo en niños y en pacientes inmunodeprimidos. En conclusión, en el presente estudio la dosificación de ADA en líquidos pleurales confirmó su utilidad para el diagnóstico etiológico de los derrames pleurales exudativos no piogénicos. La incorporación rutinaria de esta técnica entre los estudios iniciales de los derrames pleurales para el diagnóstico de la TBP, se transforma en un auxiliar imprescindible a nivel clínico y en los programas de control de la tuberculosis.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Prof. Walter Alallón por el asesoramiento científico brindado.

Summary

Background: bacteriology of pleural liquid (LP) for diagnosis of pleural tuberculosis (TBP) is slow and has low sensitivity; the biopsy of highest performance is expensive and cruel. Although adenosine deaminase (ADA) has been described as a valuable tool for diagnosis of LP, there is a lack of information and experience in our country.

Objective: to validate ADA dosage in LP for diagnosis of TBP.

Methods: ADA dosage using Giusti technique in 113 exudates of LP from 66 suspected carriers of TPB (group gTPB) with bacteriology, and 47 patients with non tuberculosis causes (control group gC). Cut point was 40 U/l.

Results: twelve patients of the gTBP showed ADA higher than 40 U/l; diagnosis TBP was done for 8 patients. For the specific cut point, ADA showed: 100% sensitivity; 93% specificity; PPV: 67%; PNV: 100%. In gC (n = 47), four samples showed ADA higher than 40 U/l (one thymoma, one lymphoma, and two empyemas).

Conclusions: ADA in LP is a sensitive and specific technique for diagnosing TBP, with high PNV. It decreases rates of biopsy and reduces time of diagnosis; it is a simple and a cheap technique. Other diseases that increase ADA in LP should be considered in the analysis of the results.

Résumé

Introduction: la bactériologie du liquide pleural (LP) pour le diagnostic de la tuberculose pleurale (TBP) est lente et peu sensible; la biopsie de meilleur rendement est sanglante et coûteuse. Même si le dosage de l'adénosine deaminase au LP est décrit comme une ressource précieuse pour le diagnostic de la tuberculose pleurale, il n'existe pas d'expérience chez nous.

Objectif: valider l'usage du dosage d' ADA au liquide

pleural pour le diagnostic de TBP.

Matériel et méthode: dosage d' ADA par technique colorimétrique de Giusti en 113 liquides pleuraux provenant de 66 patients soupçonnés de TBP (groupe gTBP) avec bactériologie réalisée et 47 patients avec des épanchements à cause non tuberculeuse, (groupe contrôle gC). La valeur de coupe a été établie à 40 U/l.

Résultats: dans le groupe gTBP, 12 patients ont présenté ADA supérieur à 40 U/l; chez huit d'entre eux, on a fait le diagnostic TBP. Pour la valeur de coupe établie, l' ADA a présenté une sensibilité de 100%; spécificité de 93%; VPP: 67%; VPN: 100%. Dans le gC (n = 47) quatre échantillons ont présenté des valeurs d'ADA supérieures à 40 U/l (une tumeur au thymus, un lymphome et deux empyèmes).

Conclusions: l'ADA en LP est une technique sensible et spécifique pour la TBP, on remarque son haut VPN; elle réduit la nécessité de biopsies et raccourcit le temps diagnostic ; elle est de facile exécution et à coût réduit. Il existe d'autres maladies qui élèvent l'ADA dans le LP qui doivent être considérées lors de l'interprétation des résultats.

Resumo

Introdução: a bacteriologia do líquido pleural (LP) para o diagnóstico da tuberculose pleural (TBP) é lenta e pouco sensível; a biópsia com melhor rendimento é invasiva e cara. Se bem a dosificação da adenosina deaminase (ADA) no LP está descrita como um recurso valioso para o diagnóstico da tuberculose pleural não existe experiência em nosso país.

Objetivo: validar o uso da dosificação de ADA no líquido pleural para diagnóstico de TBP.

Material e método: dosificação de ADA por técnica colorimétrica de Giusti em 113 líquidos pleurales provenientes de 66 pacientes com suspeita de TBP (grupo gTBP) com exame bacteriológico previo e 47 pacientes com derrames de causa não tuberculosa, (grupo controle gC). O valor de corte ficou estabelecido em 40 U/l.

Resultados: no grupo gTBP 12 pacientes apresentaram ADA superior a 40 U/l; em oito foi feito diagnóstico de TBP. Para o valor de corte estabelecido a ADA apresentou uma sensibilidade de 100%; especificidade de 93%; VPP: 67%; VPN: 100%. No grupo gC (n = 47) quatro amostras apresentaram valores de ADA superiores a 40 U/l (um timoma, um linfoma e dois empiemas).

Conclusões: a ADA no LP é uma técnica sensível e específica para TBP, ressaltando seu alto VPN; diminui a necessidade de biópsias e reduz o tempo diagnóstico; é fácil de ser realizado e apresenta baixo custo. Existem outras doenças que aumentam a ADA na LP que devem ser tomadas em conta na interpretação dos resultados.

Bibliografía

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis control: surveillance, planning financing. WHO Report 2006. Obtenido de: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/pdf/full_report.pdf. (Consulta: dic 2006).
2. **Caminero Luna JA.** Tuberculosis extrapulmonar. In: Unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias. Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. París: UICter, 2003: 328-69.
3. **Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes.** Programa Nacional de Tuberculosis. Cifras Oficiales. Años 2002-2004. Montevideo: CHLA EP, 2004.
4. **Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes.** Cifras Oficiales. Años 2002-2004. Montevideo: CHLA EP, 2005.
5. **Burgess LJ, Maritz FJ, Le Roux I, Taljaraard JFF.** The utility of adenosine deaminase as a diagnostic tool for tuberculous pleurisy. *Thorax* 1995; 50: 672-4.
6. **Kaisemamann MC, Kritski AL, Pereira MFC, Trajman A.** Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. *J Bras Pneumol* 2004; 30: 549-56.
7. **Ocana I, Martínez Vázquez JM, Ribera E, Segura RM, Pascual C.** Adenosine deaminase activity in the diagnosis of lymphocytic pleural effusions of tuberculous, neoplastic and lymphomatous origin. *Tubercle* 1986; 67(2): 141-5.
8. **Valdes L, Avarez D, San José E, Penela P, Valle JM, García-Pazos JM, et al.** Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 1998; 158(18): 1967-8.
9. **Valdes L, Pose A, San José E, Martínez Vázquez JM.** Tuberculous pleural effusions. *Eur J Intern Med* 2003; 14(2): 77-83.
10. **Ocana I, Martínez Vázquez JM, Segura RM, Fernandez De-Sevilla T, Capdevila JA.** Adenosine deaminase in pleural fluids. Tests for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* 1983; 84(1): 51-3.
11. **Giusti G, Galanti B.** Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. 2 ed. New York: Academic Press, 1974: 1092-6.
12. **Carstens ME, Burgess LJ, Maritz FJ, Taljaraard JFF.** Isoenzymes of adenosine deaminase in pleural effusions: a diagnostic tool? *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2(10): 831-5.
13. **Argentina. Ministerio de Salud y Acción Social. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Zerbini E, Imaz MS, Franco R, Togneri A, Kuszniars G, Etchart A, et al.** Utilidad de la determinación de adenosin deaminasa en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. Buenos Aires: Ministerio de Salud y Acción Social, 2001.
14. **Chen ML, Yu WC, Lam CW, Au KM, Chan AY.** Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase activity in tuberculous pleurisy. *Clin Chim Acta* 2004; 341(1-2): 101-7.
15. **Carrion-Valero F, Perpiñá-Tordera M.** Screening of tuberculous pleural efusión by discriminant analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(7): 673-9.
16. **Greco S, Girardi E, Masciangelo R, Capocetta GB, Saltini C.** Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta – analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7 (8): 777-86.
17. **Diacon AH, Van De Wal BW, Wyser C, Smedema JP, Bezuidenhout J, Bolliger CT, et al.** Diagnostic tools in tubercuous pleurisy: a direct comparative study. *Eur Respir J* 2003 ; 22: 589-91.
18. **Pérez Rodríguez E, Jiménez Castro D.** The use of adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(4): 259-66.
19. **Shanga SK, Banga A.** Pleural fluid interferon-gamma and adenosine deaminase levels in tuberculosis pleural effusion: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Lab Anal* 2005; 19(2): 40-6.
20. **Pérez Rodríguez E, Pérez Walton IJ, Sánchez Hernández JJ, Pallares E, Rubi J.** Nuevo G. ADA1/ADAp ratio in pleural tuberculosis: an excellent diagnostic parameter in pleural fluid. *Respir Med* 1999; 93(11): 816-21.
21. **Petterson T, Ojala K, Weber TH.** Adenosine deaminase in the diagnosis of pleural effusions. *Acta Med Scand* 1984; 215(4): 299-304.
22. **Strakinga WF, Nautta JJ, Straub JP, Stam J.** Adenosine deaminase activity in tuberculous pleural effusions: a diagnostic test. *Tubercle* 1987; 68(2): 137-40.
23. **Porcel JM, Vives M.** Etiology and pleural fluid characteristics of large and massive effusions. *Chest* 2003; 124: 978-83.
24. **Villena Garrido V.** Mesothelioma and pleural adenosine deaminase. *Arch Bronconeumol* 2005; 41: 175-6.
25. **Miller Kd, Barnette R, Light R.** Stability of adenosine deaminase during transportation. *Chest* 2004; 126: 1933-7.