

MÉTODOS QUÍMICOS SENCILLOS PARA DETERMINACION DE TUBERCULOSTÁTICOS EN ORINA U OTROS LIQUIDOS CORPORALES

J. VALERO SAIZ y J. E. PASTOR COS

Hospital de Enfermedades del Tórax.
Tarrasa

Introducción

Este trabajo consiste en una recopilación de métodos sencillos para el control en líquidos biológicos y en la orina fundamentalmente de los tuberculostáticos más empleados hoy en nuestro país y en todo el mundo.

La exposición se hace detallada describiendo punto por punto cada método, no entrando en justificaciones ni en razonamientos tipo químico (para ello remitimos al lector interesado a la literatura indicada en la bibliografía).

Se pretende ayudar al analista y al clínico en su tarea diaria para que, con unos métodos sencillos y fácilmente laborables, pueda controlar con seguridad a los enfermos que tomen tuberculostáticos y que planteen problemas, o bien que le interese hacer este control por las causas que considere oportunas en su momento.

Con esta recopilación no demasiada exhaustiva sólo pretendemos servir de ayuda, en alguna forma, al tratamiento de la tuberculosis que cada día presenta y presentará más problemas originados en ocasiones por olvido en la toma de la medicación, por negligencia o por comodidad.

Todos estos métodos han sido probados y se utilizan de modo rutinario en algunos servicios de nuestro hospital demostrándonos su eficacia. El utillaje, por otra parte, es muy simple y se dispone de él en todos los Centros medianamente dotados, en particular en el laboratorio de análisis clínicos.

Material, reactivos y métodos

Incluimos aquí juntos todos estos apartados por considerarlo más conveniente y cómodo para su realización y para la exposición.

Determinación de Isoniazida

Consideraremos dos casos.

1) Casos que queramos detectar la *Isoniazida total* emplearemos el reactivo de Pauneska Buzarai. El *material* necesario es muy simple, basta con disponer de matraces de 500 c.c. (no necesariamente aforados), balanza, vaso precipitado, probeta, tubo de ensayo.

Para prepararlo se mezcla, en el orden indicado, los siguientes reactivos:

Agua destilada	30 cc.
Metavanadato sódico	..	0,5 grs.
Sulfato amónico	10 grs.
Acido acético glacial	..	20 cc.
Acido sulfúrico	10 cc. que se añade poco a poco.
Amoniaco puro	20 cc. en campana extractora de humos.
Agua destilada	c.s.p. 500 cc.

Método

Se mezcla 2 cc. de orina con 2 cc. de la solución anterior, se agita y se espera a la aparición de un color ladrillo oscuro, lo que indicaría un resultado positivo.

2) Para detectar la *acetil-Isoniazida*, describimos el método seguido por Eidus y Hamilton¹. Para su elaboración basta con disponer en cuanto a *material* se refiere de probeta, vaso de precipitados, balanza, mosaico de porcelana blanca con oquedades.

Se preparan dos soluciones: a) Cianuro potásico al 10 % y b) Cloramina T al 10 %.

Precauciones: Para manejar el cianuro potásico ha de trabajarse con una buena ventilación o en campana extractora y evitando todo contacto o mezcla con soluciones ácidas.

Recibido el día 20 de febrero de 1980.



Método: Sobre el mosaico de porcelana blanca, se colocan cuatro gotas de orina, cuatro gotas de la solución de cianuro potásico y 10 gotas de cloramina T, la presencia de acetilisoniacida se demuestra mediante la aparición de un color rosa-rojo.

Determinación del ácido P-aminosalicílico

El *material* necesario se limita a una balanza, mortero, y probeta; para una prueba de escrutinio en orina el *reactivo* según Case² consiste en una mezcla de:

Sulfato de cobre anhidro	20 grs.
Nitrito sódico	100 grs.
Acido tartárico seco	100 grs.

Los materiales son molidos en morteros y luego mezclados. El polvo color rosa se almacena en botellas tapadas.

Método: A 5 cc. de orina se añade aproximadamente 100 ml del polvo anterior, y se agita inmediatamente para disolverlos.

Si hay PAS, se desarrollará un color rojo-naranja o rojo-pardo profundo; una prueba positiva puede tardar varios minutos en aparecer, pero las reacciones intensas se observan inmediatamente. Se obtiene un resultado positivo definitivo con una concentración de 4 mg/100 cc. de PAS.

Determinación de cicloserina y Pirazinamida

Se prepara unas tiras detectoras impregnando hojas de papel de filtro cortadas en tiras, con una solución recién preparada de nitropursiato sódico al 100 % y se secan a 50-65° C. Después de secas, se humedecen con una solución diluida de ácido cítrico a lo largo de líneas paralelas. Las hojas se cortan en tiras de aproximadamente 70-80 cm.

Para usarse la tira se sumerge en orina, la reacción positiva para la cicloserina aparece en 2 a 10 minutos, dando un color azul en las tiras que tengan el ácido cítrico. La reacción positiva para la pirazinamida da un color rojo al mismo tiempo sobre la otra sección de la misma tira.

La prueba es sensible para 20 microgramos/cc. de cicloserina y para 30 microgramos/cc. de pirazinamida.

Variante de este método

Como *reactivos* se emplea una solución acuosa al 2 % de nitropursiato sódico, que se añade al momento a igual volumen de una solución 1N de hidróxido sódico más seis gotas de orina y se agita suavemente. Si aparece color rojo la prueba es positiva a la pirazinamida. Se añaden además cuatro gotas de ácido clorhídrico concentrado, si da color azul la prueba es positiva a la cicloserina (conviene no guardar más de 5 días los *reactivos* en un frasco de color oscuro).

El *material* necesario se compone de papel de filtro corriente, balanza, vaso de precipitado, probeta y frascos de color oscuro.

Determinación de etambutol

Hemos de disponer para realizarlos de una balanza, papel de filtro, embudos, probeta, centrífuga y espectofotómetro visible.

El principio se fundamenta en la extracción del etambutol con cloroformo en presencia de alcali. El extracto se evapora hasta dar polvo y se determina mediante la separación de un complejo cromático de etambutol-bromotimol en benceno.

Reactivos:

Hidróxido potásico	4 N.
Cloroformo (grado reactivo)	
Benceno (grado reactivo)	
Acido clorhídrico	0,1 N.

Azúl de Bromotimol al 0,1 %: 100 mg. de azul de bromotimol se disuelven en 100 ml. de azul de bromotimol se disuelven en 100 ml. de amortiguador de fosfatos con un PH de 7,0 (0,05 M). La solución resultante se lava tres veces con un volumen igual de Benceno, y todo el benceno se elimina mediante centrifugación.

Procedimiento: (para soluciones hasta 30 microgramos-cc.)

a) A 2cc de la muestra, añádanse 2 cc. de KOH 4N. y 50 cc. de cloroformo.

b) Agítese durante 10 minutos y centrifúguese.

c) Se elimina la fase acuosa aspirándola. La fase clorofórmica se filtra a una probeta limpia (se ha de procurar que no pase nada de agua a la fase clorofórmica).

d) Agréguese 0,1 cc. de ácido clorhídrico, 0,1 N cloroformo y evapórese hasta que quede pulverulento.

e) Al residuo se añaden 0,2 cc. de solución de azul de bromotimol y 2 cc. de benceno.

f) Agítese, centrifúguese y léase la fase de benceno a 400 micrometros en un espectrofotómetro.

Stándares: suero de un individuo normal que nunca haya recibido etambutol y suero standar con etambutol hasta concentraciones de 4 y 8 microgramos/ml más un testigo de agua.

Observaciones: En sangre una dosis de 25 mgr/kg produce cifras a las dos horas de 4-5 microgramos/ml., a las 4 horas de 1-2 microgramos/ml., a las 24 horas 0,1 µg/ml. (datos del Brompton Hospital).

Determinación de la Etionamida³:

Material necesario: Matríz aforado, balanza, probeta, centrífuga, vaso de precipitado, lámpara de arco (luz U.V. ultravioleta de 350 nm).

Reactivos: Amortiguador de fosfato de potasio 4M a pH 7,0.

Cloroformo.

Ferricianuro potásico al 2 % (solución recién preparada).

Acido acético glacial.

Se evitará la presencia de impurezas fluorescentes.

Método:

1. En una probeta obturada de 15 × 150 mm viértase 5 cc. de orina, 5 cc. de amortiguador y 5 cc. de cloroformo. Agítese vigorosamente.

2. Centrifúguese a 2.000 rpm durante 5 minutos.

4. Se añade 1 cc. de solución de ferricianuro y 1 cc. de solución de NaOH. Agítese bien.

3. Se separa la capa de cloroformo en una probeta.

5. A continuación se elimina la capa acuosa y se añade 1 cc. ácido acético glacial al extracto clorofórmico.

6. Una vez bien mezclada se lee con luz ultravioleta. (con una lámpara de arco de 350 nm.) en cuarto oscuro. Resultados positivos se indican mediante fluorescencia azul-púrpura.

Determinación de la tiosemicarbazona

Material: Balanza, vaso de precipitado, probeta.

Reactivos según el método descrito por Short en 1961⁴.

Acido clorhídrico 2 N.

Nitrito Sódico, en solución acuosa al 0,3 %.

Sulfamato amónico, idem. 1,5 %.

Clorhídrico de 1-N naftiletildiamina, idem al 1 %.

Método:

1. Mezclarse 0,5 cc. de orina con 0,5 cc. de HCL 2N y con 4 cc. de agua destilada en una probeta.

2. Calentar en agua hirviendo 20 minutos, después se enfría con agua durante 10 minutos.

3. Se añaden 2 gotas de solución de nitrito sódico, se mezcla y se deja en reposo 3 minutos.

4. Se agregan 2 gotas de solución de sulfamato amónico, se mezcla se deja en reposo durante tres minutos.

5. Después se mezclan dos gotas de la solución de clorhidrato de 1-N-Naftiletildiamina.

6. Al cabo de 15-20 minutos, un color rosa indica un resultado positivo.

Determinación de la rifampicina

La rifampicina, tanto acetilada como sin acetilar, proporciona un color a la orina tan significativa, que raramente se

plantea la necesidad de investigarla por otro procedimiento químico. De todos modos, para completar la exposición, describimos un método que además de sencillo es muy espectacular en cuanto a sus resultados.

Reactivos:

Nitrato férrico	5 grs.
Acido Nítrico	10 cc.
H ₂ O destilada	100 cc.

Método: 15 gotas de esta solución se añaden a 10 ml. de orina, se agita y se observa el cambio de color. La presencia de un color rojo es significativa e indica que el enfermo ha tomado rifampicina. Para mejor comprobación, este color se puede extraer fácilmente con cloroformo con una leve agitación.

Comentario

Empezamos describiendo dos métodos para la determinación de la isoniazida en orina tanto si se presenta en forma acetilada o sin acetilar, lo que nos sirve además de detectarla, para descubrir en alguna medida, el tipo de acetilador. Ambos métodos son sencillos, los reactivos fáciles de conseguir así como las soluciones de trabajo. Los métodos son suficientemente sensibles para las dosis usuales de isoniazida.

La investigación de para-aminosalicílico, también en orina, permite la detección de hasta 4 mg/100 de este compuesto. Hay que tener presente que, a veces, una prueba positiva tarda varios minutos en aparecer.

La cicloserina y pirazinamida se hacen simultáneamente preparando tiras reactivas que nos descubren hasta 20 microgramos/ml de cicloserina y 30 microgramos/ml. de pirazinamida, grado de sensibilidad suficiente para el tipo de investigación a realizar. Se incluye una variante

de este método por si resultara incómodo preparar las tiras mencionadas, ya que algunas soluciones han de ser de reciente preparación. De todas formas hemos comprobado que, en condiciones adecuadas, las tiras permanecen activas más de dos meses.

Los métodos para el etambutol y ethionamida requieren un utillaje algo más complicado pero del que se dispone en cualquier laboratorio de análisis.

Para la tiosemicarbazona y para la rifampicina el material necesario es el mismo, los métodos son sencillos y permite ponerlos en marcha a cualquier persona interesada en utilizarlos.

En todos los casos, el grado de sensibilidad es suficiente, tanto en lo que se refiere a la determinación en orina como en algún otro líquido; esta detección podría ser incluso cuantitativa en algunos casos, preparando los patrones adecuados.

Finalmente los reactivos son de fácil adquisición corrientes y de bajo precio y además las cantidades requeridas son muy pequeñas.

BIBLIOGRAFIA

1. EIDUS, L. y HAMILTON, E. J.: A new method for the determination of n-acetil isoniazid in urine of ambulatory patients. *J. Exp. Med.*, 83: 409, 1964.
2. CASE, E. M.: A new metods for detecttion of para-aminolicylic acid in urine. *Tubercle*, 42: 531, 1967.
3. VENTAKARAMAN, P.; EIDUS, L., TRIPATHY, S. P. y VELUS, S.: Fluorescent test for the detection of Ethionamida, metabolites in urine. *Tubercle*, 48: 291, 1967.
4. SHORT, E. I.: The estimation of isonicotiny, acid hydracide and some of its metabolites in urine. *Tubercle*, 42: 218, 1961.