



## *Prueba de reducción del NBT. Significado, utilidad e implicaciones*

Por el Dr.:

ALBERTO BARRANTES B.\*

Barrantes B., A. *Prueba de reducción del NBT. Significado, utilidad e implicaciones.* Rev Cub Ped 47: 1, 1975.

Se revisan el significado, utilidad e implicaciones de la prueba de reducción del NBT. Se presentan los resultados obtenidos en 98 pacientes estudiados con diferentes estados febriles, incluidos algunos con linfoma. Se reafirma la confiabilidad y utilidad de la prueba y se recomienda su utilización.

A finales del siglo pasado, 1883, *Metchnikoff* formuló la primera teoría celular de la inmunidad al observar que un material extraño (bacterias, colorante) introducido en los tejidos de un equino-dermo, la estrella de mar, era rápidamente rodeado, ingerido y eventualmente destruido por células móviles. *Metchnikoff* interpretó el fenómeno como representante de una variedad de respuesta inmune, independiente de la humoral, destinada a proteger al organismo de intrusos peligrosos; con el tiempo se ha demostrado la participación de ambos mecanismos, tanto el celular como el humoral, en la respuesta inmune.<sup>1</sup>

Los fenómenos de inmunidad celular a las infecciones se reducen a tres procesos diferentes: a) la fagocitosis, que parece depender de factores séricos más que de una reactividad celular modificada (opsoninas), b) la muerte intracelular de los microorganismos, ejecutada por sustancias la mayor parte inespecíficas y producidas espontáneamente por los fagocitos (lizozima, fagocitina, histonas y protaminas); y c) la digestión intracelular del material fagocitado, mediada por enzimas intracelulares probablemente inducidas y dirigidas específicamente contra los compuestos que constituyen la partícula fagocitada (fosfatasa ácida, nucleotidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, beta-glucoronidasa, catepsina, lizozima, fosfatasa alcalina y tal vez otras aún no determinadas).

\* Director del Laboratorio de Investigación Clínica. Hospital México. Caja Costarricense de Seguro Social. San José, Costa Rica.

En el curso de una infección natural en una persona cuyos neutrófilos funcionen normalmente, los organismos infectantes son fagocitados por los neutrófilos "in vivo". Tal acción puede inducir cambios metabólicos suficientes en estos neutrófilos para causar reducción espontánea "in vitro" del *nitroblue tetrazolium* en una proporción mayor de neutrófilos en comparación con gente sana y con pacientes con enfermedad no bacteriana.

Tal fue la teoría que postularon *Park et al* en 1968<sup>2</sup> cuando introdujeron la técnica de reducción del NBT para la diferenciación de ciertos tipos de infecciones bacterianas de aquellas enfermedades no bacterianas algunas veces confundidas debido a la fiebre, leucocitosis y otros síntomas clínicos.

Las sales de *tetrazolium* han sido utilizadas ampliamente en estudios histoquímicos de varias enzimas; en el sitio de actividad enzimática la sal incolora es reducida a formazán, que es insoluble en agua y puede ser reconocido fácilmente como un depósito azul oscuro.<sup>2</sup>

La técnica de reducción del NBT se empleó inicialmente para estudiar los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, entidad que se caracteriza por incapacidad de los neutrófilos de reducir el NBT, pero que conservan su capacidad de fagocitar. Los neutrófilos de estos pacientes tienen una deficiencia metabólica que se atribuye a falta de NADH oxidasa. En este caso, es útil el empleo del NBT estimulado con endotoxina en que los pacientes con esta enfermedad lo dan negativo y los pacientes normales darán hasta un 50% de los neutrófilos positivos.

La leucocitosis frecuentemente acompaña infecciones bacterianas, pero, incidentes de *stress* como quemaduras, cetoacidosis diabética, disturbios emocionales y ejercicio extenuante pueden producir leucocitosis y limitar su utilidad en el diagnóstico dife-

rencial.<sup>3</sup> Es aquí donde se pone de manifiesto la utilidad de la prueba de reducción del NBT porque la vamos a encontrar, salvo algunas excepciones, elevada en infecciones bacterianas y fúngicas sin tratamiento.

El mecanismo de reducción del NBT a formazán en el citoplasma del fagocito no está enteramente claro. Parece que la membrana celular debe ser alterada para la penetración del colorante y que la diforasa del NBT (NADH oxidasa) es la responsable de la transferencia del ión hidrógeno de la forma reducida del NADH al NBT, encontrándose esta enzima en los gránulos del citoplasma (lisosomas).<sup>4</sup>

En opinión del *Dr. Park*,<sup>4</sup> dos condiciones deben tomarse en cuenta cuando se lleva a cabo la reducción espontánea del NBT: a) que el sistema fagocitario del huésped, tanto celular como humoral, esté operando normalmente, b) que la infección envuelva la circulación sistemática.

*Park et al*, en 1968,<sup>2</sup> encontraron en individuos normales un promedio de 8,5% (3-10%) de neutrófilos positivos, en pacientes con meningitis bacteriana 46,6% (18-70%), en septicemia por *C. albicans* 43,2% (25-56%), en otras infecciones bacterianas agudas 28,7% (12-35%) y en infección viral 9,5% (3-13%). Los resultados de *Humbert et al*<sup>5</sup> y *Feigin et al*<sup>6</sup> sobre el particular son muy similares.

Se diferencia el trabajo de *Feigin et al*<sup>6,7</sup> en que estudiaron 247 pacientes durante el curso de su hospitalización con enfermedad febril, dividiéndolos en ocho grupos dependiendo del tipo de enfermedad. Se llevó a cabo la prueba del NBT y un conteo de leucocitos con diferencial en cada uno de los pacientes. Sobre la base de estos números se calcularon los valores porcentuales y absolutos de neutrófilos NBT positivos. Con estos datos se construyó un nomograma que permitió colocar los ocho grupos iniciales de trabajo dentro de cua-

tro grupos que se clasificaron de la siguiente manera: A) Normales, B) Infección viral, infección bacteriana parcialmente tratada y enfermedad febril no infecciosa, C) Infección bacteriana no tratada, D) Infección bacteriana inefectivamente tratada (gráfico).

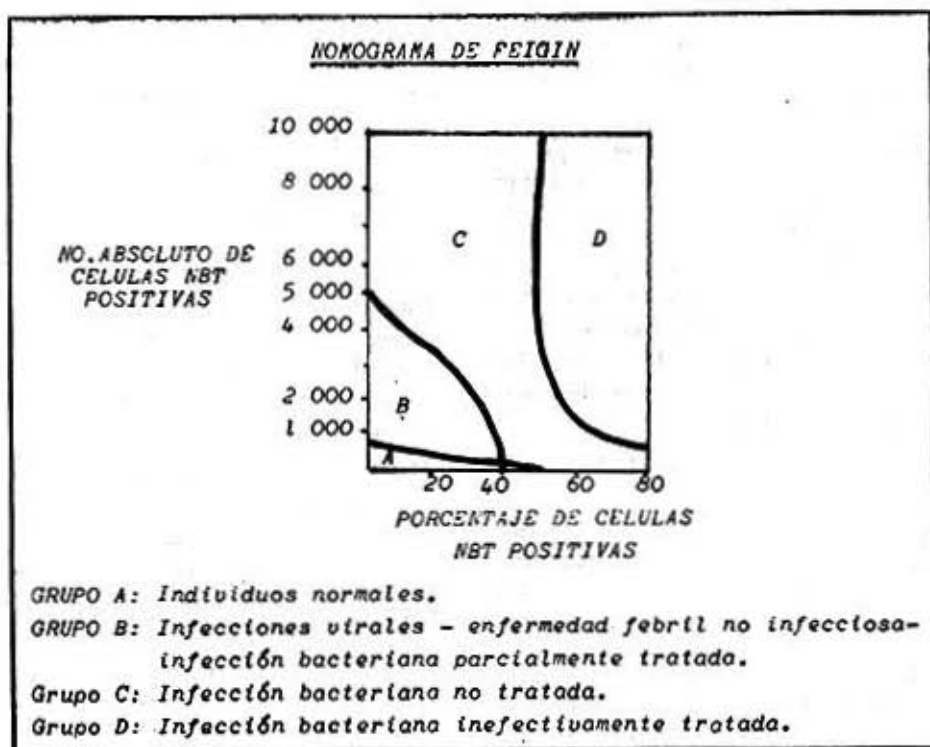
Con el porcentaje y el valor absoluto de células NBT positivas es posible clasificar al paciente estudiado dentro del grupo correspondiente. Las probabilidades de una correcta clasificación aumentan cuanto más alejado de la línea de división se halle el punto.

La imposibilidad de diferenciar pacientes con infección bacteriana efectivamente tratada de pacientes con enfermedad viral, es debido a la rapidez con que el porcentaje de células NBT positivas baja hacia lo normal con una terapia antibiótica efectiva.<sup>6</sup>

Feigin ha demostrado que el porcentaje de células NBT positivas es muy importante de tomar en cuenta,<sup>3</sup> puesto que ha visto pacientes con infección bacteriana bien documentada con una proporción absoluta de células NBT positivas baja, pero con un alto porcentaje de células positivas. Ha observado lo contrario en pacientes con leucocitosis que no poseen infección bacteriana,<sup>4</sup> pero opina que es importante tomar en cuenta que la eficacia de una clasificación correcta se encuentra aumentada cuando ambos parámetros son tomados en cuenta.<sup>3</sup>

Es importante tener en cuenta que existen en esta prueba, como en muchas otras pruebas de laboratorio, falsos negativos y falsos positivos.

Dentro de los falsos negativos más importantes se encuentran los defectos congénitos en el componente humoral y celular



del sistema fagocitario.<sup>9</sup> Otros falsos negativos se observan cuando la función de los leucocitos está alterada como sucede en pacientes con quimioterapia con citotóxicos, alcohólicos, con *stress* quirúrgico, con quemaduras, con infección por virus influenza, con insuficiencia vascular como sucede en enfermedad por Hemoglobina S,<sup>5</sup> y con nefrosis.<sup>3</sup> Además cualquier infección localizada que no es reflejada en la circulación sistémica puede ser responsable de un resultado falso negativo.<sup>4</sup>

En los falsos negativos se encuentran los pacientes con osteogénesis imperfecta por haber un consumo de oxígeno y actividad de la vía de las pentosas monofosfato aumentada; y los hemofílicos, en aquellos que tienen sangrado leve o terapia transfusional, por fagocitosis inducida por la fibrina.<sup>2</sup> Una respuesta falsa positiva en el recién nacido, está relacionada con una actividad metabólica aumentada de los leucocitos.<sup>4</sup> Además se observan falsos positivos en la malaria y la nocardiasis,<sup>3</sup> en pacientes que han recibido vacuna contra la tifoidea<sup>3</sup> y en pacientes con Síndrome de Chediack-Higashi.<sup>8</sup>

Es importante tomar en cuenta que no hay ninguna correlación entre la fiebre y el número total de leucocitos con el porcentaje de células NBT positivas tanto en infecciones bacterianas como en enfermedades febriles no bacterianas.<sup>5,6</sup> Estos hallazgos de no correlación sirven para enfatizar la independencia de los cambios enzimáticos celulares y el conteo de leucocitos durante la infección.<sup>7</sup>

Con respecto al resultado de la prueba en pacientes con terapia de esteroides, hay opiniones divididas y resultados diferentes de varios investigadores,<sup>2,10</sup> por eso debe interpretarse con precaución en pacientes recibiendo corticoesteroides.<sup>9</sup>

El período de tiempo necesario para aumentar el porcentaje de células NBT positivas es imposible de precisar. En algu-

nos pacientes con meningitis bacteriana a los cuales se le hizo la prueba dentro de las doce horas del inicio de los síntomas clínicos, el porcentaje de células NBT positivas se encontraba cerca de treinta.<sup>6</sup>

La reducción a valores normales después de terapia antibacteriana puede ser tan rápida como dieciocho horas, independiente del total de leucocitos.<sup>5,11</sup> Los índices pueden permanecer anormalmente elevados por un largo período de tiempo si la respuesta clínica al tratamiento es pobre.<sup>4</sup> Durante el tratamiento de infecciones bacterianas se produce una inhibición específica de la reducción lisosomal del NBT.

*Rubinstein et al*<sup>12</sup> incubaron neutrófilos con antibióticos y observaron que no se producía disminución en la reducción, únicamente con valores arriba de los terapéuticos, pero aún en altas concentraciones eran capaces de fagocitar las bacterias. Proponen estudiar si esta disminución en la reducción del NBT se debe: a) productos tóxicos bacterianos, b) productos que salen de la bacteriolisis, como en la reacción de *Herxheimer* después de terapia con penicilina en pacientes luéticos, c) algunas drogas antimicrobianas.

## MATERIAL Y METODO

Fueron estudiados 98 pacientes con distintas entidades nosológicas, muchas de las cuales cursan con fiebre y leucocitosis pudiendo ser confundidas con enfermedad bacteriana. Sólo 9 eran personas sanas sin problemas de ninguna especie.

A todos se les practicó un conteo de leucocitos y una fórmula diferencial; además, una prueba de reducción del NBT (Sigma). A los pacientes con diferentes tipos de linfomas se les practicó además determinación de fosfatasas alcalinas leucocitarias (Sigma) y cuantificación de fibrinógeno plasmático (Dade), para estimar su grado de actividad.

El método del NBT se practicó como lo propuso *Park et al* en 1968,<sup>2</sup> con la única modificación de tomar la muestra con citrato de sodio (proporción 1:9) y no con heparina.

Sobre la base de los resultados obtenidos se procedió a clasificar a los pacientes de acuerdo con el nomograma de *Feigin et al*<sup>3</sup> (gráfico) y luego se correlacionó este resultado con el proceso patológico que presentaban los pacientes.

### RESULTADOS

Del total de personas estudiadas, 52 fueron clasificadas como del Grupo A (53,0%), pero cuatro fueron sacados por no corresponder al grupo A ya que tenían un porcentaje de células NBT positivas muy alto, pero con un valor absoluto muy bajo debido a la leucopenia que tenía tres y a la granulopenia que tenía uno (cuadros I y II). Los otros 48 presentaron un promedio de células NBT de 8,0%.

Fueron clasificados en el Grupo B 26 pacientes (26,5%) con un promedio de células NBT positivas de 18,8% (cuadro III).

Asimismo, 17 pacientes (17,3%) fueron clasificados en el Grupo C con un promedio de células NBT positivas de 36,7% (cuadro IV) y 3 pacientes en el Grupo D con un promedio de 58,6% de células NBT positivas (cuadro V).

Fueron catalogados con base a las fosfatasas alcalinas leucocitaria, a la cuantificación de fibrinógeno y a los hallazgos clínicos 18 linfomas no hodgkinianos y 5 linfomas de *Hodgkin* como activos, que son los que están clasificados en los grupos B, C y D. Los que se encuentran en el grupo A son todos inactivos.

No se encontró correlación entre los valores de fosfatasa alcalina y fibrinógeno con el porcentaje de células NBT positivas en ninguno de los pacientes con linfoma activo.

### DISCUSION

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos decir que estos se relacionan bastante, con algunas excepciones, con aquellos obtenidos por *Park et al*,<sup>2</sup> *Feigin et al*<sup>3</sup> y *Humbert et al*.<sup>4</sup>

Podemos ver que cuatro pacientes clasificados como del Grupo A (cuadro II) no corresponden en realidad a este grupo ya que tienen un porcentaje de células NBT positivas muy alto, por eso sobre la base de la recomendación de *Feigin*<sup>3</sup> los sacamos y tomamos en cuenta únicamente el porcentaje. No los colocamos en ningún otro grupo, pero si tomamos en cuenta el porcentaje de células positivas podríamos decir que pertenecen al grupo B.

Dentro de los clasificados del grupo B podemos ver que una septicemia está colocada dentro de este grupo, esto debido a que el número de leucocitos era bajo todavía, pero en una determinación posterior fue clasificada en el grupo C.

Todas las infecciones bacterianas, incluyendo una vasculitis con infección concomitante estudiadas, fueron clasificadas en el grupo C. Asimismo algunos pacientes que llegaron como infección bacteriana que se clasificaron en el grupo A, no se le pudo comprobar etiología bacteriana y son algunos de los que están en el subgrupo de enfermedad febril no infecciosa. Ante estos resultados podemos reafirmar que el método es bastante satisfactorio para la diferenciación de infección bacteriana de otros problemas no bacterianos que pueden ser confundidos.

Con respecto a los linfomas tanto de *Hodgkin* como los no hodgkinianos, estos aparecen en los grupos B, C o D, cuando están activos y en el grupo A cuando no lo están. Este es un dato importante a tener en cuenta para no llegar a confusiones cuando se lleve a cabo la determinación de la prueba de reducción del NBT.

### CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos creemos que esta prueba es de bastante confianza para la diferenciación de estados febriles no infecciosos, de estados infecciosos. Esto, unido a la simplicidad de la prueba la hacen de gran utilidad diagnóstica.

Debe tenerse cierto cuidado en la interpretación de los resultados cuando se lleva a cabo la prueba en pacientes con linfoma, tanto de *Hodgkin* como no *hodgkinianos*, porque podemos ver que cuando están activos pueden darnos bastante positiva la prueba del NBT. No creemos que sea una prueba útil y confiable para detectar la actividad de los linfomas, ya que existen, además, otros métodos más selectivos y seguros.

Como afirma el *Dr. Park*,<sup>13</sup> esta prueba es de gran utilidad clínica: a) como un medio de mantener el diagnóstico en la

diferenciación de ciertas enfermedades no bacterianas, de infección bacteriana, b) como medio de estudiar pacientes con alta susceptibilidad a infecciones, por ejemplo: durante periodos pre y posoperatorios, durante procesos de trasplante y durante terapia inmunosupresora.

El valor diagnóstico de esta prueba está marcadamente aumentado cuando se llevan a cabo determinaciones seriadas en un periodo de tiempo.<sup>14</sup>

Como *Feigin et al*<sup>6</sup> puntualizan, la historia clínica, el examen físico, así como otros exámenes de laboratorios y gabinete no deben dejarse de lado cuanto esta prueba es empleada como ayuda diagnóstica.

Su utilización en el repertorio de la rutina de un laboratorio clínico, ante la utilidad que nos brinda, parece bien justificada.

### CUADRO I

#### PACIENTES CLASIFICADOS EN EL GRUPO A

	No. de pacientes	Porcentaje promedio
Normales	9	8,1
Linfoma no Hodgkiniano	16	7,6
Enfermedad febril no infecciosa	10	8,2
Linfoma de Hodgkin	7	9,4
Leucemias mieloblásticas	2	8,5
Anemias	2	7,5
Posparto	1	7,0
Hipertiroidismo	1	4,0
Total:	48	8,0

CUADRO II

PACIENTES CLASIFICADOS EN EL GRUPO A  
CON % DE CELULAS NBT POSITIVAS ALTO

	% células NBT (+)	Leucocitos Por mm <sup>3</sup>	Porcentaje granulocitos
Linfoma de Hodgkin	22	4 600	72
Linfoma de Hodgkin	30	3 900	42
Adenopatías	23	5 600	41
Artritis reumatoide	22	10 000	23
Promedio	24,2		

CUADRO III

PACIENTES CLASIFICADOS EN EL GRUPO B

	No. de pacientes	Porcentaje promedio
Enfermedad febril no infecciosa	12	18,3
Linfoma no Hodgkiniano	6	16,0
Linfoma de Hodgkin	3	28,6
Enfermedad viral	1	23,0
Infección bacteriana en tratamiento	1	12,0
Prótesis valvular	1	8,0
Paragonimiasis	1	15,0
Septicemia	1	21,0
Total:	26	18,8

*Como se ve en este cuadro la enfermedad viral y la infección bacteriana en tratamiento son difíciles de diferenciar por este método. (Ver texto para explicación).*

CUADRO IV

PACIENTES CLASIFICADOS EN EL GRUPO C

	No. de pacientes	Porcentaje promedio
Linfoma no Hodgkiniano	10	38,7
Infección bacteriana	5	33,2
Vasculitis (infección bacteriana)	1	30,0
Linfoma de Hodgkin	1	41,0
Total:	17	36,7

CUADRO V

PACIENTES CLASIFICADOS EN EL GRUPO D

	No. de pacientes	Porcentaje promedio
Linfoma no Hodgkiniano	1	58
Reticulosarcoma	1	63
Linfoma de Hodgkin	1	55
Total:	3	58,6

SUMMARY

Barrantes, B. A. *Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test. Its significance, usefulness and implications.* Rev Cub Ped 47: 1, 1975.

The significance, usefulness and implications of the NBT reduction test are reviewed. Results obtained in 98 studied patients with different febrile conditions, some them with lymphoma, are presented. The reliability and usefulness of this test is reassured, and its use is recommended.

RESUME

Barrantes B. A. *Epreuve de réduction du NBT (nitrobleu tetrazolium). Signification, utilité et implications.* Rev Cub Ped 47: 1, 1975.

On fait la révision de la signification, utilité et implications de l'épreuve du NBT. On donne les résultats obtenus chez 98 malades étudiés présentant de différents états fébriles et aussi quelquesuns avec lymphome. On arrive à la conclusion que l'épreuve est très utile.



## РЕЗЮМЕ

Варрантес В.А. Тест снижения NBT . Его значения,выгодность и последствия. Rev Cub Ped 4/1: 1,1975 .

Рассматриваются значения,выгодность и последствия теста снижения NBT. Представляются полученные результаты у 98 больных различными лихорадочными состояниями и больных лимфомами. Утверждается выгода этого теста и рекомендуется его применение .

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—Pérez Tamayo, R. et al. Inmunopatología, I ed, pp. 161. La Prensa Médica Mexicana, México, 1968.
- 2.—Park, B. H. et al. Infection and NBT reduction by neutrophils. Lancet 2: 532, 1968.
- 3.—Feigin, R. D. NBT test in the diagnosis of febrile patients. New Engl J Med 285: 347, 1971.
- 4.—Park, B. H. The use and limitations of the NBT test as a diagnostic aid. J Pediatr 78: 376, 1971.
- 5.—Humbert, J. R. et al. The histochemical NBT reduction test in the differential diagnosis of acute infections. Pediatrics 48: 259, 1971.
- 6.—Feigin, R. D. et al. NBT dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. J Pediatric 78: 230, 1971.
- 7.—Feigin, R. D. et al. Prospective use of the NBT dye test in febrile disorders. J Pediatr 78: 943, 1971.
- 8.—Crush, O., A. Maurer. Neutrophil function and NBT dye reduction. Lancet 2: 383, 1969.
- 9.—Ng, R. P. et al. NBT test—false negative or false positive results. Lancet 1: 1341, 1972.
- 10.—Wollman, M. R. et al. The NBT test usefulness in detecting bacterial infections in uremic and immunosuppressed trasplant patients. Lancet 1: 289, 1972.
- 11.—Douwes, F. R. Clinical value of NBT test. New Engl Med 287: 282, 1972.
- 12.—Rubistein, A. et al. False-negative NBT test due to transiente malfunction of neutrophils. Lancet 1: 382, 1973.
- 13.—Park, B. H., R. A. Good. NBT test stimulated. Lancet 2: 616, 1970.
- 14.—Editorial. NBT: a routine test? Lancet 2: 909, 1971.

Recibido el trabajo: julio 29, 1974.