

La Prueba de Reducción del N.B.T.

DR. ALBERTO BARRANTES B. *

DR. CARLOS MONTERO U. **

En los últimos diez años, se han efectuado estudios clínicos y de laboratorio para investigar el papel del leucocito en sangre periférica como defensor primario del huésped contra la infección bacteriana y micótica. Estos estudios han permitido una definición más exacta de entidades nosológicas clínicas que guardan relación con el desarrollo y la función del leucocito y también comprensión más básica de los mecanismos que participan en el desarrollo y la función de esta célula.

Las células de la sangre que poseen la propiedad peculiar de fagocitar son las encargadas de la defensa del huésped contra la infección piógena y por hongos.

Fue a finales del siglo pasado, 1883, cuando Metchnikoff formuló la primera teoría celular de la inmunidad al observar que un material extraño (bacterias, colorante) introducido en los tejidos de un equinodermo, 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 (35).

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 (lisozima, fagocitina, histonas y protaminas); y c) la digestión intracelular del material fagocitado, mediada por enzimas intracelulares probablemente inducidas y dirigidas específicamente contra los compuestos de la partícula fagocitada (fosfatasa ácida, nucleotidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, beta-glucuronidasa, catepsina, lisozima, fosfatasa alcalina y aún otras no determinadas).

En el curso de una infección en una persona cuyos neutrófilos funcionan normalmente, los organismos infestantes son fagocitados por los neutrófilos. Tal acción puede inducir cambios metabólicos suficientes en estos neutrófilos

* Laboratorio de Investigación Clínica Hospital México.

** Sección de Medicina Unidad de Hematología Hospital México.

para causar reducción espontánea "in vitro" del nitroblue tetrazolium (N.B.T.) en una proporción mayor de neutrófilos, comparados con gente sana y con pacientes con enfermedad no bacteriana.

Tal fue la teoría que postularon Park et al en 1968 (32) cuando introdujeron la técnica de reducción del N.B.T. 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 usadas 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 (32).

La técnica de reducción del N.B.T. se usó inicialmente para estudiar los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, entidad que se caracteriza por incapacidad de los neutrófilos a reducir el N.B.T., pero que conservan su capacidad de fagocitar. Los neutrófilos de estos pacientes tienen una deficiencia metabólica que se atribuye a la falta de NADH oxidasa. En estos casos es útil el uso del NBT estimulado con endotoxina (3, 5, 33). Los pacientes con esta enfermedad lo dan negativo y los pacientes normales darán hasta un 50% de los neutrófilos positivos.

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, inducida la permeabilidad por la fagocitosis de la bacteria o por la liberación de sus productos, y que además la diaforasa 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) (28, 31, 34, 39).

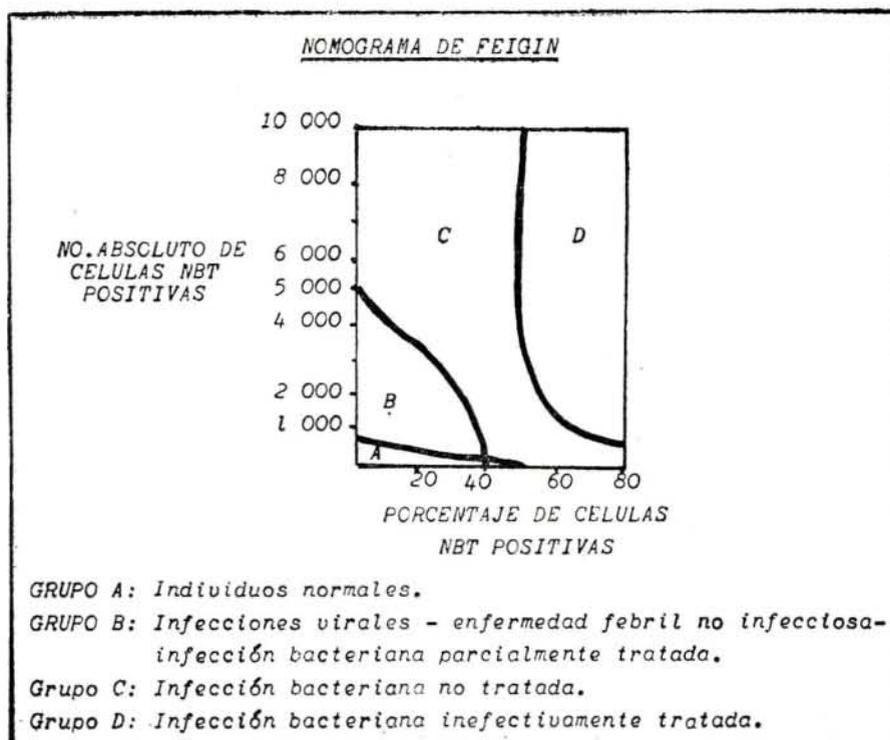
La leucocitosis frecuentemente acompaña infecciones bacterianas, pero, incidentes de stress como quemaduras, cetoacidosis diabética, disturbios emocionales y ejercicio extenuante pueden producir leucocitosis y limitar su utilidad en el diagnóstico diferencial (13). Es aquí donde se pone de manifiesto 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 y normal en otras circunstancias (1, 6, 7, 17, 18, 21, 26, 27, 37, 40, 42, 44, 45).

En opinión de Park (34) 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 sistémica.

Park et al en 1968 (32) 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 (24) y Feigin et al (12) sobre el particular son muy similares.

Feigin et al (12) 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.

Con base en 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 cuatro grupos.



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 (12).

Feigin (13) ha demostrado que el porcentaje de células NBT positivas es muy importante de tomar en cuenta, 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 (12), pero opina que es importante considerar que la eficacia de una clasificación correcta se encuentra aumentada cuando ambos parámetros son tomados en cuenta (13).

Existen en esta prueba, como en muchas otras pruebas de laboratorios, falsos negativos y falsos positivos (2).

Dentro de los falsos negativos más importantes se encuentran los defectos congénitos en el componente humoral y celular del sistema fagocitario (30). 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 (24), y

con nefrosis (13). Además cualquier infección localizada que no es reflejada en la circulación sistémica puede ser responsable de un resultado falso negativo (34).

Falsos positivos se encuentran en los pacientes con osteogénesis imperfecta por haber un consumo de oxígeno y actividad de la vía de las pentosas monofosfato aumentada y los hemofílicos, que tienen sangrado leve o terapia transfusional, por fagocitosis inducida por la fibrina (24). Una respuesta falsa positiva en el recién nacido, está relacionada con una actividad metabólica aumentada de los leucocitos (34). Además se observan falsos positivos en la malaria y la nocardiasis (13), en pacientes que han recibido vacuna contra la tifoidea (24) y en pacientes con síndrome de Chediak-Higashi (20).

Pujol-Moix (36) ha observado que pacientes diabéticos son capaces de aumentar la actividad del NBT bajo la influencia de enfermedades no infecciosas, pero fallan en respuesta a infecciones, esto confirma el trabajo de De la Vega (9) en que menciona la presencia de inhibidores de la reducción del NBT en el plasma de pacientes con infección y diabetes.

Czannutzki et al (8) han visto el NBT aumentado en vasculitis alérgica y eritema nodoso, y postulan que debe ser interpretado con cuidado y considerado de utilidad limitada en la evaluación de pacientes dermatológicos.

En un estudio previo (4) observamos que en pacientes con linfoma, tanto de Hodgkin como no hodgkinianos, la prueba de reducción del NBT se encuentra aumentada cuando estos están activos. Tomando en cuenta el nomograma de Feigin (12) cuando están activos se encuentran dentro de los grupos B, C o D y cuando no tienen actividad en el grupo A.

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 (12, 24). Estos hallazgos de no correlación sirven para enfatizar la independencia de los cambios enzimáticos celulares y el conteo de leucocitos durante la infección (12).

Con respecto al resultado de la prueba en pacientes con terapia esteroidea, hay opiniones divididas y resultados diferentes de varios investigadores (32, 47), por eso debe interpretarse con precaución en pacientes recibiendo corticosteroides (30).

El período de tiempo necesario para aumentar el porcentaje de células NBT positivas es imposible de precisar. En algunos pacientes con meningitis bacteriana a los cuales se les 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 (12).

La reducción a valores normales después de terapia antibacteriana puede ser tan rápida como dieciocho horas, independiente del total de leucocitos (10, 12). Los índices pueden permanecer anormalmente elevados por un largo período de tiempo si la respuesta clínica al tratamiento es pobre (34). Durante el tratamiento de infecciones bacterianas se produce una inhibición específica de la reducción lisosomal del NBT.

Rubinstein et al (38) 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 (exotoxinas); 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.

Como afirma el Dr. Park (33) 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 períodos 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 período de tiempo (11).

Como Feigin et al (12) puntualizan, la historia clínica, el examen físico, así como otros exámenes de laboratorio y gabinete no deben dejarse de lado cuanto ésta prueba es empleada como ayuda diagnóstica.

Su utilización en el repertorio de la rutina de un laboratorio clínico —tomando en cuenta las modificaciones al método existente (15, 19, 22, 23, 25, 29, 46)—, ante la utilidad que nos brinda, parece bien justificada (8), en contraposición a lo afirmado por Steigbigel et al (39).

R E S U M E N

Se revisa la prueba de reducción del NBT en relación a su mecanismo de reducción, significado, utilidad e interpretación clínica. Se enfatiza en el hecho de no dejar de lado la historia clínica, el examen físico y otros exámenes de laboratorio cuando esta prueba es empleada como ayuda diagnóstica.

S U M M A R Y

The NBT reduction test in relation with its reduction mechanism, utility and clinical interpretation is reviewed. We recommend not to forget the clinical history, physical examination and other laboratory tests when this test is used as diagnostic help.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—ALLEN, H. B.
Letter: NBT test. *Lancet*. 2:917, 1973.
- 2.—ASHBURN, P. et al.
NBT reduction: false positive and false negative results. *Blood*. 41:921, 1973.
- 3.—BAEHNER, R. L. and NATHAN, D. G.
Quantitative NBT test in Chronic Granulomatous Disease. *New Eng. J. Med.* 278:971, 1968.
- 4.—BARRANTES, A.
Prueba de reducción del NBT. Significado, utilidad e implicaciones. *Rev. Cub. Ped.* 47:5, 1975.
- 5.—BELCHER R. W. et al.
A simple screening test for Chronic granulomatous disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 60:450-2, 1973.
- 6.—BITTNER, S. J. et al.
The use of the unstimulated NBT test as a routine screening test for bacterial infection in a adult population. Reassessment. *Am. J. Clin. Pathol.* 60:843-53, 1973.
- 7.—CURRERI, B. W. et al.
Stimulated NBT test to assess neutrophil antibacterial function: prediction of wound sepsis in burned patients. *Surgery*. 74:6-13, 1973.
- 8.—CZANNUTZKI, B. M. et al.
The NBT test in dermatologic patients. *Arch. Dermatol.* 109:36, 1974.

- 9.—DE LA VEGA, G. et. al.
Plasma factor affecting the NBT reducing capacity of neutrophils. *N. Eng. J. Med.* 289:271, 1973.
- 10.—DOUWES, F. R.
Clinical value of NBT test. *New Engl. J. Med.* 287: 822, 1972
- 11.—Editorial: NBT: a routine test? *Lancet.* 2:909, 1971.
- 12.—FEIGIN, R. D. et. al.
NBT dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. *J. Pediatric.* 78:230, 1971.
- 13.—FEIGIN, R. D.
NBT test in the diagnosis of febrile patients. *New Engl. J. Med.* 285:347, 1971.
- 14.—FEIGIN, R. D. et. al.
Prospective use of the NBT dye test in febrile disorders. *J. Pediatr.* 78:943, 1971.
- 15.—FREEMAN, R. et. al.
A modification of the NBT test. *Lancet.* 2:1154, 1971.
- 16.—FREEMAN, R. et. al.
Serial NBT test in the management of infection. *J. Clin. Pathol.* 26:57-9, 1973.
- 17.—GORDON, A. M. et. al.
Routine application of the NBT test in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Pathol.* 26:52-6, 1973.
- 18.—GORDON, A. M. et. al.
Letter: The NBT test. *Lancet.* 2:1085, 1973.
- 19.—GREEN, A. E. et. al.
Letter: Technique for the NBT test. *J. Clin. Pathol.* 26:726-7, 1973.
- 20.—GRUSH, O. and MAURER, A. M.
Neutrophil function and NBT dye reduction. *Lancet.* 2:383, 1969.
- 21.—HELLUM, K. B.
Positive NBT test in acute viral hepatitis. *Lancet.* 1:1181, 1973.
- 22.—HELLUM, K. B. et. al.
Influence of anticoagulants on the NBT test. *Scand. J. Infect. Dis.* 5:67, 1973.
- 23.—HELLUM, K. B. et. al.
Influence of incubation time and temperature on the NBT test. *Scand. J. Infect. Dis.* 5:145-7, 1973.
- 24.—HUMBERT, J. R. et. al.
The histochemical NBT reduction test in the differential diagnosis of acute infections. *Pediatrics* 48:259, 1971.
- 25.—LAPES, M. et. al.
Letter: Bone-Marrow response to endotoxin stimulated NBT. *N. Engl. J. Med.* 289:1255-6, 1973.
- 26.—MANDELL, G. L. and FULLER, L. F.
NBT dye test: a diagnostic aid in tuberculosis. *An. Rev. Resp. Dis.* 105:123-125, 1972.
- 27.—MATULA, G. and RAAS, M.
NBT dye test. *Ann. Intern. Med.* 79 (5): 759, 1973.
- 28.—NATHAN D. G.
Editorial: NBT reduction by human phagocytes. *N. Eng. J. Med.* 290:280-281, 1974.
- 29.—NEVWIRTOVA, R. et. al.
NBT and cell clumping. *N. Engl. J. Med.* 288:970, 1973
- 30.—Ng, R. P. et. al.
NBT test-false negative al false positive results. *Lancet.* 1: 1341, 1972.
- 31.—PACHMAN L. M. et. al.
Rheumatoid sera and soluble complex: NBT dye test and hexosa monophosphate shunt activation. *Pediatrics.* 52:823-30, 1973.

- 32.—PARK, B. H. et. al.
Infection and NBT reduction by neutrophils *Lancet*. 2:532, 1968.
- 33.—PARK, B. H. and GOOD, R. A.
NBT test stimulated. *Lancet*. 2:616, 1970.
- 34.—PARK, B. H.
The use and limitations of the NBT test as a diagnostic aid. *J. Pediatr.* 78:376, 1971.
- 35.—PEREZ TAMAYO, R. et. al.
Inmunopatología, E ed., pp. 161. La Prensa Médica Mexicana, México, 1968.
- 36.—PUJOL-MOIX, M. N.
NBT reducing capacity of neutrophils in diabetes. *N. Eng. J. Med.* 289:920, 1973.
- 37.—RIDGWAY, G. L. et. al.
The NBT test in system bacterial infections. *Lancet*. 1:1180, 1973.
- 38.—RUBINSTEIN, A. et. al.
False-negative NBT test due to transiente malfunction of neutrophils. *Lancet*. 1:382, 1973.
- 39.—SE7AL, A. W. et. al.
The mechanism of the entry of dye into neutrophils in the NBT test. *Clin. Sci. Mol. Med.* 45:817-26, 1973.
- 40.—SHAPER, R. M. et. al.
NBT dy reduction by neutrophils from patients with streptococcal pharyngitis. *Pediatrics*. 51:284-8, 1973.
- 41.—SILVERMAN E. M. et. al.
The NBT test in lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 60:198-201, 1973.
- 42.—SOONATTRAKUL W. et. al.
Diagnostic accuracy of the NBT test. *Arch. Intern Med.* 132:529-532, 1973.
- 43.—STEIGBIGEL, R. T. et. al.
The NBT reduction test versus conventional Hematology in the diagnosis of bacterial infection. *N. Eng. J. Med.* 290:235-238, 1974.
- 44.—VICKERS, P. J. et. al.
NBT test *Lancet*. 2:738, 1973.
- 45.—WENGER, M. E. et. al.
NBT dye reduction by peripheral leukocytes from rheumatoid arthristis and systemic lupus erytrematous patients measured by a histochemical and spectrophometric method. *J. Lab. Clin. Med.* 82:513-21, 1973.
- 46.—WILL GU et. al.
Modification of NBT test. *N. Eng. J. Med.* 289:867, 1973.
- 47.—WOLLMAN, M. R. et. al.
The NBT test usefulness in detecting bacterial infections in uremic and immunosuppressed transplant patients. *Lancet*. 1:289, 1972.