

APLICACION DIAGNOSTICA DEL NITROAZUL DE TETRAZOLIUM

M. RESTREPO, C. AGUDELO, J. MOLINA, L. ARISTIZABAL

Hemos evaluado la prueba de la reducción del nitroazul de tetrazolium realizada por los leucocitos circulantes, en un total de 170 personas. Se encontró que sirve como ayuda diagnóstica en los pacientes con septicemias, al hacerse la reacción francamente positiva. Otras entidades febriles como infecciones piógenas no generalizadas, tuberculosis, absceso hepático amibiano y malaria, presentaron la prueba dentro de los límites normales. En las micosis sistémicas existe una alteración mayor que en las superficiales, con diferencias significativas entre la Paracoccidioidomicosis tratada y no tratada.

En entidades febriles de origen no bacteriano, con leucocitosis marcada o sin ella, como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea o ciertos tumores malignos, la prueba fue normal.

Drs. Marcos Restrepo, Carlos Agudelo, Javier Molina y Srta. Luz Aristizábal: Sección de Inmunología, Reumatología y Alergias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín,

Solicitud de separatas al Dr. Restrepo, Laboratorio Departamental, Servicio Seccional de Salud de Antioquia, Medellín.

INTRODUCCION

El nitroazul de tetrazolium (NAT) es una sustancia incolora que adquiere color azul-negro cuando es reducido, debido a la gran avidez por iones hidrógeno dentro de los leucocitos durante el proceso de fagocitosis. Baehner y Nathan(1), en 1967 demostraron que una pequeña proporción de polimorfonucleares reducen "in vitro" espontáneamente el NAT, formando en su interior un precipitado insoluble de formazan, sucediendo esto por un aparente estímulo de fagocitosis (2,3).

El mecanismo de la prueba no se ha comprendido en forma precisa, siendo necesario de todas maneras que exista una alteración de la membrana del neutrófilo, que puede ser inducida por su exposición a bacterias o sus productos. La reducción del colorante dentro del neutrófilo depende de la presencia y actividad de la enzima NADPH oxidasa, en la estimulación de la vía de la hexosa monofosfato durante la fagocitosis (3). Inicialmente Park y col. (2) en 1968, utilizaron esta prueba para demostrar la ausencia de enzimas dentro de los leucocitos como sucede en la enfermedad granulomatosa crónica, en donde existe fagocitosis de

Tabla 1- *Entidades clínicas de las 170 personas estudiadas.*

ENTIDAD CLINICA		No. de Personas
Clínicamente normales		12
Infecciones Bacterianas	Septicemias	19
	Otras infecciones por Piógenos	6
	Tuberculosis	18
Micosis	Paracoccidioidomycosis	25
	Candidiasis	6
Infecciones por Protozoos	Absceso Hepático Amibiano	4
	Malaria	32
Enfermedades Autoinmunes	Lupus Eritematoso Diseminado	20
	Artritis Reumatoidea	12
Hepatitis		6
Tumores		10
Total		170

las bacterias pero no se realiza bacteriolisis y por lo tanto hay una falta absoluta de reducción del colorante por parte de los neutrófilos. Estos mismos autores (2,3) observaron que la reducción del NAT estaba aumentada en los neutrófilos de la sangre periférica en presencia de infecciones bacterianas, sugiriendo que esta prueba ayudaría al diagnóstico rápido de infecciones.

En el presente trabajo utilizamos este procedimiento de reducción del azul de tetrazolium, como prueba para diferenciar infecciones bacterianas de otras infecciones (3) o enfermedades inflamatorias no bacterianas.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron en total 170 personas, agrupadas en diferentes entidades (Tabla 1). A cada uno de los pacientes se les hizo un leucograma completo y para la prueba del

nitroazul de tetrazolium (NAT o NBT), se utilizó el método original descrito por Park y colaboradores (2) en 1968 en el cual se emplea 0.1 ml. de sangre venosa heparinizada (75 a 100 unidades de heparina por ml.) con un volumen igual de azul de tetrazolium en buffer de fosfato, pH 7.2; incubación de 25 minutos y finalmente extendidos cuidadosamente en porta-objetos para ser coloreados con Wright (Figura 1). Al microscopio se determina el porcentaje de polimorfonucleares con depósito de formazan (Figuras 2 y 3).

Consideramos como normales, las cifras recomendadas por Gordon y Col. (4) en 1973, quienes informaron un promedio de reducción de 6.1% y un rango que varió entre 1 y 14%. Valores mayores del 14% se tomaron como anormales.

RESULTADOS

En la gráfica 1 se encuentra que nuestro grupo control de personas adultas entre

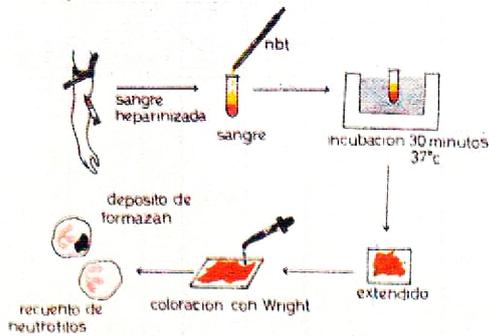


Figura 1 - Pasos a seguir en la prueba de Azul de Tetrazolium.

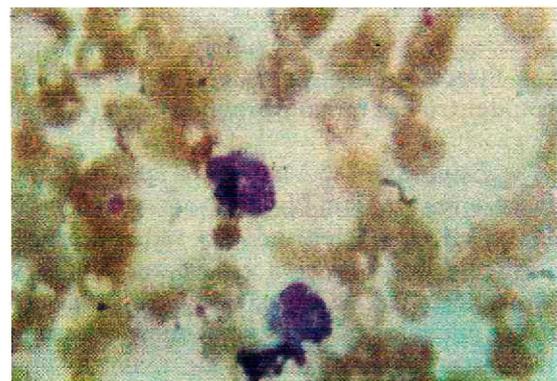
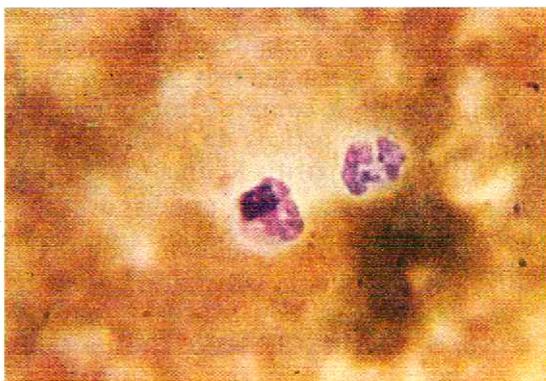
23 y 35 años y clínicamente sanas, nos dió un promedio de reducción del colorante del 5.4%, todos dentro del rango ya enunciado como normal.

El grupo con reacciones más elevadas, (Gráfica 1), correspondió al de las septicemias; en estos pacientes se llegó al diagnóstico definitivo, al encontrar los hemocultivos positivos, varios días después de la prueba. Las bacterias aisladas fueron: Estafilococo aureus en 9, Escherichia coli en 6 y 1 caso de: Meningococo, Klebsiella, Enterobacter y Alcaligenes. Con excepción de 2 pacientes, todos tuvieron las reacciones anormales, la media fue de 27.9% y la máxima de 68% en una septicemia por Echerichia coli. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los agentes etiológicos.

En un pequeño número de pacientes con otro tipo de infecciones producidas por bacterias piógenas (Gráfica 1), encontramos dos pruebas francamente positivas; correspondientes a un niño con meningitis por Escherichia coli con una reducción del 52% y un aborto séptico por bacilos gram-negativos con 47%. Los otros casos presentaron porcentajes de reducción baja y correspondieron a un paciente con absceso faríngeo por Estafilococo aureus, otro con abscesos subcutáneos múltiples por la misma bacteria; un tercero con celulitis por Estreptococo pyogenes y el último con una infección urinaria por Escherichia coli.

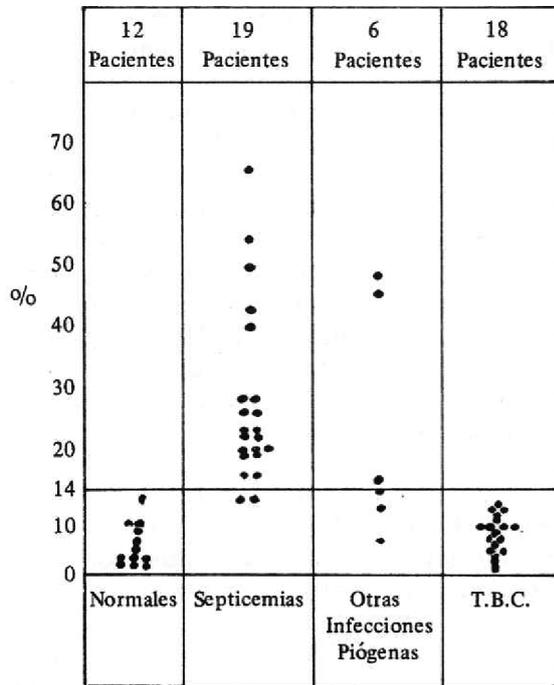
En otro tipo de enfermedades bacterianas (Gráfica 1) como la tuberculosis pulmonar activa, las pruebas estuvieron siempre dentro de los límites normales, con una media de 6.8%.

En la Gráfica 2 se muestran las pruebas practicadas en varias infecciones producidas por hongos y protozoos. En los 9 pacientes con paracoccidioidomicosis que, en el momento de la prueba, no habían recibido tratamiento, el resultado tiende a salir de los límites normales, con una media de 15.1%; en cambio los 16 pacientes restantes que ya habían sido tratados por un tiempo largo, presentaron una media de 8.5%. Entre estos dos grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$).



Figuras 2 y 3 - Aspecto microscópico de leucocitos con depósitos de colorante.

I- PRUEBA CON AZUL DE TETRAZOLIUM



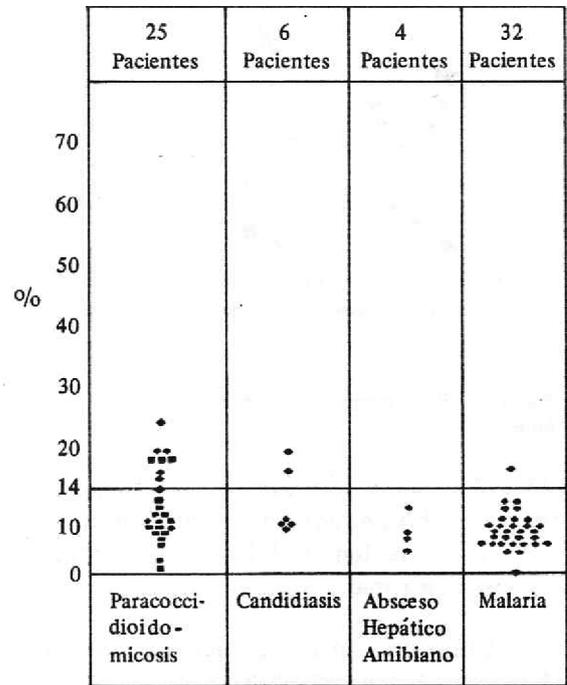
Gráfica 1 - Positividad de la prueba en grupo normal y pacientes con septicemias, otras infecciones piógenas y tuberculosis.

En los 6 pacientes con Candidiasis, aunque es un grupo pequeño, es interesante anotar que los dos que están por encima del 14%, corresponden a Candidiasis granulomatosa crónica diseminada y los valores bajos, se encontraron en lesiones localizadas en piel o mucosas.

De los individuos parasitados con protozoos, los 4 abscesos hepáticos amibianos sin infección bacteriana agregada, estuvieron dentro del rango normal.

Estudiamos 32 pacientes con malaria, 9 de ellos, tenían Plasmodium vivax y 23 Plasmodium falciparum. En todo el grupo la media de reducción estuvo en 7.4% y con excepción de un paciente con Plasmodium falciparum, las pruebas fueron normales. Este enfermo además de malaria, presentó leucocitosis con neutrofilia y se sospechó una infección bacteriana que no fue posible comprobar. No se encontraron

II- PRUEBA CON AZUL DE TETRAZOLIUM



Gráfica 2- Positividad de la prueba en pacientes con Paracoccidiodomicosis, Candidiasis, Absceso Hepático Amibiano y Malaria.

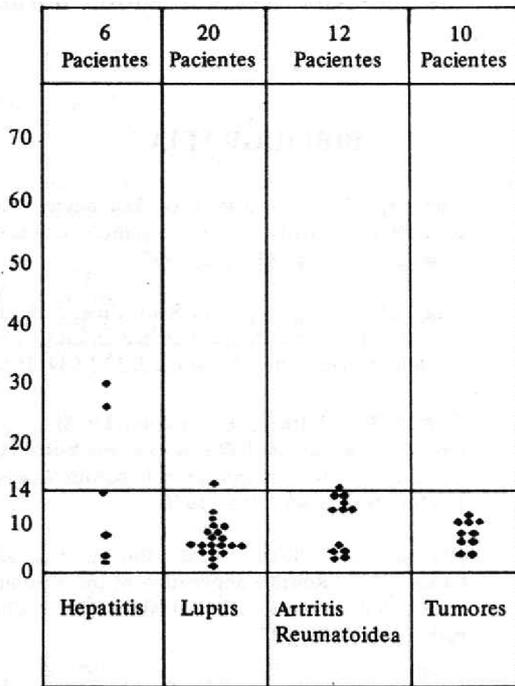
diferencias significativas entre las dos especies de Plasmodium.

En la Gráfica 3, observamos en la primera columna, 6 pacientes con diagnóstico de hepatitis y se nota que la distribución de la reducción del colorante fue variada en los diferentes casos. Las otras tres columnas de esta misma gráfica, se refieren a grupos de pacientes que presentaron síndromes febriles con o sin leucocitosis y en los cuales posteriormente se comprobaron por el laboratorio los diagnósticos de Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoidea y Linfoma o Melanoma, cuyas pruebas de reducción del colorante se consideraron como normales.

DISCUSION

La prueba del azul de tetrazolium se ha convertido en un método de ayuda para el diagnóstico de infecciones bacterianas y

III- PRUEBA CON AZUL DE TETRAZOLIUM



Gráfica 3- Positividad de la prueba en pacientes con Hepatitis, Lupus, Artritis Reumatoidea y Tumores.

su diferenciación de otras infecciones, colagenosis y de ciertas enfermedades de carácter maligno (2,5-7).

En nuestro estudio se observó una franca reacción positiva en las septicemias; aunque tuvimos 2 pacientes con la prueba dentro de límites normales, a quienes se les comprobó bacteriológicamente una septicemia, lo que puede catalogarse como falsa reacción negativa; otros autores (5,6,8-10) informan algunos casos semejantes. Los porcentajes de reducción del colorante bajos, correspondieron a infecciones localizadas, sin bacteremia. Otros investigadores (11-13) con un número mayor de pacientes obtuvieron resultados similares y observaron como nosotros, que las bacterias coliformes en infecciones sistémicas, causan a menudo pruebas más elevadas en contraste con los procesos localizados, como los de

tracto urinario bajo y las faringo-amigdalinas que no elevan notoriamente la reacción.

En la tuberculosis pulmonar y en la meningitis tuberculosa se han informado índices bajos de reducción del colorante (2,4-6,14-16); en nuestros 18 pacientes con tuberculosis pulmonar activa no tratada, observamos las pruebas dentro de los límites normales.

En cuanto a las micosis, las publicaciones existentes son escasas; inicialmente Park y Col. (2) informaron resultados positivos en pacientes con septicemias por *Candida albicans*. Posteriormente Soonattrakul y Andersen (6) mencionan dos casos de meningitis por *Cryptococcus* en los cuales la prueba estaba ligeramente por encima de lo normal en uno de ellos. Bittner y Col. (17) tanto en un caso de candidiasis sistémica como en otro con candidiasis mucocutánea crónica, encontraron el NAT dentro de límites normales. En nuestros pacientes las micosis sistémicas tuvieron una tendencia a estar ligeramente por encima del límite normal, como ocurrió en la mayoría de pacientes con paracoccidioidomicosis no tratada y en los dos casos con candidiasis granulomatosa crónica diseminada.

La prueba del nitroazul de tetrazolium en las parasitosis, también ha sido poco evaluada. Chrétien y Garagusi (18) presentaron 4 casos de parasitosis, tanto por helmintos como por protozoos, incluyendo un caso de absceso hepático amibiano, en los cuales la prueba aparece con un aumento en la positividad. En nuestros 4 pacientes con amibiasis hepática, ninguno estuvo por encima del límite normal.

En malaria, los pocos casos publicados (5,6,18,19) hablan de un aumento de positividad del NAT. Contrariamente a estos autores, en el grupo de 32 pacientes que estudiamos, la media de reducción del colorante estuvo en 7.4% y solamente uno llegó a 18% y fue un paciente quien al parecer tenía una infección bacteriana sobreagrega-

da, caso similar al informado por Gjerlöff-Schmidt y Col. (20) en un paciente con malaria y fiebre tifoidea y la prueba del NAT mayor del 60%. Con el número de pacientes con malaria estudiados por nosotros podemos afirmar en forma categórica que la prueba no se altera en infecciones por *P. vivax* ó *P. falciparum*.

En los pacientes con hepatitis viral los porcentajes de reducción fueron variados, pero con este número tan reducido no se puede llegar a una conclusión definitiva. Para evaluar las virosis es necesario ampliar el número de pacientes con diferentes infecciones. Otros autores (4,6,14,17,21) afirman que en las infecciones virales, en las que se incluyen casos de hepatitis, la prueba del NAT está casi siempre dentro de los límites normales.

En pacientes con síndromes febriles diferentes a los de origen microbiano con ó sin leucocitosis como puede ocurrir en el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoidea y las neoplasias, la prueba se comportó como en los individuos normales, estando de acuerdo con lo informado por otros autores (2,6,8,17,20,22). En estas entidades también se han observado cambios en el porcentaje de reducción de la prueba al llevar a cabo el tratamiento; Wenger y Col. (22), Tratt y Col. (23) y Tan y Col. (24) afirman que cuando se administran esferoides la reacción está disminuida, por el contrario en aquellas enfermedades en donde existe un aumento de la susceptibilidad a infecciones piógenas, estas hacen elevar el índice de reducción.

SUMMARY

The nitroblue tetrazolium test (NBT) was evaluated in a group of 170 patients and controls. Our findings showed that the test was a useful diagnostic tool in the patients with septicemia. In untreated pulmonary tuberculosis, amoebic hepatic abscess, malaria and in other non-infectious febrile illnesses such as rheumatoid arthritis, systemic lupus

erythematosus, malignancies and in normal controls the NBT test was within normal limits.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Baehner, R.L. and Nathan, D.G.: Leucocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 155: 835-836, 1967.
- 2.- Park, B.H., Fikrig, S.M. and Smithwick, E.M.: Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. *A Diagnostic aid. Lancet* 2: 532,534,1968.
- 3.- Baehner, R.L., Nathan, D.G., Karnovsky, M.L.: Correction of metabolic deficiencies in the leucocytes of patients with chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 49: 865, 1970.
- 4.- Gordon, A.M., Rowan, R.M., Brown, T.G. and Carson, H.C.: Routine application of the nitroblue tetrazolium test in the clinical laboratory. *J. Clin. Pathol.* 26:52-56, 1973.
- 5.- Matula, G. and Paterson, P.Y.: Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. *New Engl. J. Med.* 285: 311-317, 1971.
- 6.- Soonattrakul, W. and Anderson, B.R.: Diagnostic accuracy of the nitroblue tetrazolium test. *Arch. Intern. Med.* 132: 529-532, 1973.
- 7.- Schmidt, K., Klitgaard, N.A., Simonsen, E.E. and Mortensen, O.K.: The diagnostic value of the NBT-test in the case of febrile diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 34: 83-90, 1974.
- 8.- Feigin, R.D., Shackelford, P.G., Choi, S.C., Flake, K.K., Franklin, F.A. and Eisenberg, C.S.: Nitroblue tetrazolium dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. *J. Pediat.* 78: 230-237, 1971.
- 9.- Park, B.H.: The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. *J. Pediat.* 78: 376-378, 1971.
- 10.- Campos, M.E., Rabinovich, S. and Smith, I.M.: The nitroblue tetrazolium test. An evaluation of the false positive and false negative results. *Arch. Intern. Med.* 133: 432, 436, 1974.
- 11.- Bjorkstén, B. and Chateau, P.: Use of the nitroblue tetrazolium (NBT) test in the differentiation between pyelonephritis and cystitis. *Acta. Pediat. Scand.* 64: 182-186, 1975.

- 12.- Bjorkstén, B., Ekstiand, T., Gothefors, L. and Ostberg, Y.: The nitroblue tetrazolium (NBT) test and white blood cell count in acute throat infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 7: 45-49, 1975.
- 13.- Bjorkstén, B. and Wahlby, L.: The nitroblue tetrazolium (NBT) and white blood cell count in patients with acute abdominal pain, with special reference to acute appendicitis. *Acta. Chir. Scand.* 141: 65-68, 1975.
- 14.- Fikrig, S.M., Berkovich, S., Emmett, S.M. and Gordon, C.: Nitroblue tetrazolium dye test and differential diagnosis of meningitis. *J. Pediat* 82: 855-857, 1973.
- 15.- Mandell, G.L. and Fuller, L.F.: Nitroblue tetrazolium dye test in Tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 105: 123-125, 1972.
- 16.- Ryden, S.E. and Silverman, L.F.: Nitroblue tetrazolium test in tuberculosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 62: 431-434, 1974.
- 17.- Bittner, S.J., Kieff, E., Windhorst, D. and Meir, P.: The use of the unstimulated nitroblue tetrazolium test as a routine screening test for bacterial infection in an adult population: A reassessment. *Am. J. Clin. Pathol.* 60: 843-853, 1973.
- 18.- Chretien, J.H. and Garagusi, V.F.: N.B.T. Test in Parasitic Diseases. *Lancet* 2: 549, 1971.
- 19.- Andersen, B.R.: NBT - Test in Malaria. *Lancet* 2: 317, 1971.
- 20.- Gjerløff-Schmidt, K., Klitgaard, N.A., Efsen-Simonsen, E. and Koldkjaer-Mortensen, O.: The diagnostic value of the NBT test in the case of febrile Diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 34: 83-90 1974.
- 21.- Sher, R., Anderson, R., Rabson, A.R. and Koornhof, H.J.: Standardisation of the nitro-blue tetrazolium test and factors affecting its clinical application. *S. Afr. Med. J.* 48: 209-212, 1974.
- 22.- Wenger, M.E. and Bole, G.G.: Nitroblue tetrazolium dye reduction by peripheral leukocytes from rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients measured by a histochemical and spectrophotometric method. *J. Lab. Clin. Med.* 82: 513-521, 1973.
- 23.- Tratt, G.E., Myers, A.R., Moellering, R.C., Weinberg, A.N. and Bloch, K.J.: Assessment of leukocyte function in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 13: 353-354, 1970.
- 24.- Tan, C.V., Rosner, F. and Feldman, F.: Nitroblue tetrazolium dye reduction in various hematologic disorders. *N.Y. State J. Med.* 73: 952-956, 1973.