

OBSERVAÇÕES DE CARÁTER DIAGNÓSTICO RELATIVAS AO TESTE DO "NITROBLUE TETRAZOLIUM"

Jacyr PASTERNAK (1), Vicente AMATO NETO (2) e Carlos Armando de AVILA (3)

RESUMO

Mediante uso de padronização efetuada por um dos Autores (J.P.), foram realizadas observações de caráter diagnóstico através do teste do "nitroblue tetrazolium". A casuística analisada constou de indivíduos normais, de pacientes acometidos de infecções bacterianas, inclusive adequada ou insatisfatoriamente tratadas, e de afecções granulomatosas, viroses, tumores, doença de Hodgkin e lupus eritematoso sistêmico. Como verificações fundamentais, houve constatação de que a prova em apreço presta valioso auxílio no sentido de informar se determinada enfermidade é presumivelmente causada por bactérias e se ocorreu evolução satisfatória, quanto às mesmas, depois de instituição de terapêutica apropriada. Tais fatos encerram, sem dúvida, valor em tarefas que envolvem necessidade de esclarecer a natureza de processos mórbidos de diversos tipos. Salientaram os Autores a conveniência de aumentar as investigações especulativas, doutrinárias e diagnósticas ligadas ao exame em questão e, ainda, de procurar utilizá-lo amplamente no terreno da febre de origem indeterminada. Frisaram também que se torna impreterível tentar desvendar o comportamento dele no setor das moléstias transmissíveis e, em particular, das patologias regionais de diferentes países.

INTRODUÇÃO

O reconhecimento da exata natureza de acometimentos febris representa tarefa nem sempre realizável com facilidade, uma vez que percalços de várias ordens podem criar ponderáveis dificuldades. Os processos que conduzem aos diagnósticos específicos e definitivos e, portanto, confirmatórios, são fundamentais, uma vez que prestam informações plenamente conclusivas; no entanto, essas técnicas, que possibilitam detecção dos agentes etiológicos ou de anticorpos, comumente não fornecem com presteza os resultados e afiguram-se bastante trabalhosos. Os métodos que propiciam apoios inespecíficos nem sempre atuam de forma valiosa e até mesmo estabelecem, por vezes, orientações desnorteantes; eles avaliam alterações protéicas e

enzimáticas, como também estão relacionados com mecanismos de coagulação sanguínea e respostas metabólicas, por exemplo, sendo o hemograma, sem dúvida, o tipo mais representativo desses exames, pelo menos quando o emprego rotineiro é encarado como fator de referência.

A disponibilidade de prova laboratorial singelamente executável, inclusive em ambientes onde recursos materiais não são abundantes, corresponde a desiderato de há muito perseguido relativamente à especificação do tipo de determinada afecção febril e, mais detalhadamente, à eventual participação causal de bactérias. Essa ponderação explica o interesse que comunicação de PARK & col.¹⁶,

Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira".
Serviço de Doenças Transmissíveis (Diretor: Prof. Vicente Amato Neto).

- (1) Chefe da Seção de Diagnóstico e Terapêutica.
- (2) Diretor.
- (3) Médico.

pertinente ao teste do "nitroblue tetrazolium", despertou em 1968.

As pesquisas referentes à doença granulomatosa hereditária fatal, ligada a distúrbio leucocitário, evidenciaram que glóbulos brancos dos indivíduos por ela afetados são incapazes de reduzir o corante citado, por deficiência da NADH oxidase (BERENDS & col.²; HOLMES & col.^{7,8}; BAEHNER & NATHAN¹; PARK & col.¹⁸; PIETU & GERNIERS²¹). A partir dessa verificação, PARK & col.¹⁵ consideraram que no decorrer de infecções ocorrem reações globais, ficando os fagócitos dotados de maiores quantidades de enzimas e estimulados para exercer suas funções, surgindo então a conveniência de comparar o que sucede com o "nitroblue tetrazolium" em circunstâncias clínicas diversas e na normalidade.

Várias comunicações frisaram a validade do raciocínio em questão e demarcaram, acima de tudo, a utilidade do recurso laboratorial proposto para diferenciação de infecções bacterianas de outras patologias. Entre essas notificações merecem destaque as de autoria de PARK & GOOD¹⁷, PARK & col.¹⁹, FEIGIN & col.^{5,6}, HUMBERT & col.⁹, MATULA & PATERSON¹² e PARK¹⁵.

Procedimentos técnicos não totalmente uniformes foram empregados, impedindo perfeitas comparações dos resultados obtidos, mas a possibilidade de identificação de enfermidades atribuíveis a bactérias, se bem que por intermédio de maneira isenta de valor decisivo, comumente ficou enfatizada. Com referência a recém-nascidos e à participação de hemofilia e de osteogênese imperfeita, o encontro de cifras anormais e elevadas documentou exceções dignas de menção e independentes da influência dos microrganismos antes focalizados (COCCHI & col.³; HUMBERT & col.⁹; LIKAKOS & VLACHOS¹⁰).

Em face à indiscutível proeminência do tema, procuramos prestar cooperação acerca de conhecimentos com ele ligados, relatando as deduções de estudo que realizamos e concernente ao diagnóstico diferencial entre diferentes modalidades de moléstias, usufruindo da padronização do teste concretizada por PASTERNAK²⁰ e que perseguiu o intuito primordial de providenciar desejável simplificação.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos "nitroblue tetrazolium" da firma "Sigma" e com o de outras procedências não conseguimos empreender a prova. Assim agimos depois de informação fornecida por PARK¹⁴, que recebeu pedido de explicação de nossa parte. Empregamos o corante a 0,1% (peso/volume), em solução salina, fisiológica, a 0,85%.

Usamos sempre heparina de mesma origem ("Liquémine", "Roche"). Não nos detivemos no estudo desse aspecto, mas valorizamos a possibilidade de variações conforme a proveniência do anticoagulante e da presença de preservativo nas preparações que o contém.

O sangue foi sistematicamente colhido e manipulado em recipientes de vidro e, portanto, não trabalhamos com materiais de plástico, como fizeram PARK & col.¹⁶, FEIGIN & col.¹⁵ e MIESCHER & LAMBERT¹³. Assim, procuramos agir com maior simplicidade e acreditamos que tal atitude não piorou o poder discriminativo. Para procedermos dentro desse espírito, decidimos não incluir a glicose na mistura de incubação e percebemos que o teste, praticado sem excesso de heparina e em período de tempo adequado não esbarra em obstáculos dependentes da morfologia do esfregaço.

A técnica adotada envolveu obediência aos detalhes a seguir especificados:

a) obtenção de 5 ml de sangue, com seringa molhada anteriormente com heparina, em quantidade suficiente para haver humedecimento, sendo rejeitado o excesso;

b) deposição imediata do líquido coletado em tubo estéril e início do exame propriamente dito antes de decorridos 15 minutos em relação à sangria;

c) colocação de 0,5 ml da solução de "nitroblue tetrazolium" em banho-maria a 37°C e, após decurso de pelo menos três minutos, adição de 1 ml de sangue, com conveniente agitação;

d) retirada de alíquota aos 15 minutos, para preparo de esfregaço a ser exposto ao método de Leishman, com fixação no prazo de 15 a 20 segundos e coloração em fase habitual de sete minutos, havendo acréscimo da costureira porção, igual, de água;

e) determinação da taxa de neutrófilos "nitroblue tetrazolium"-positivos, por contagem de 100 células, consecutivamente; chegamos, por vezes, a computar 200, mas logo deduzimos que essa forma de proceder não é vantajosa;

f) as estruturas orçadas são as que englobam granulações negras diferentes das tóxicas habituais, perceptíveis quase sempre em blocos e em quantidades variáveis, possuindo tamanhos até iguais à metade de lobo de núcleo (Fig. 1);

g) preparação, paralelamente, de esfregaço de sangue não incubado, para corar pelo processo de Leishman e determinar a percentual de neutrófilos, em seguida à apreciação de 200 leucócitos; para estabelecer números globais por mm^3 , é preciso recorrer às condutas tradicionais ou, para facilitar as tarefas, a aparelhos que funcionam automaticamente;

h) caracterização da cifra absoluta de neutrófilos "nitroblue tetrazolium"-positivos por multiplicação da porcentagem registrada pelo valor estabelecido na etapa indicada no item anterior.

Julgamos apropriado frisar que captação não valorizada por nós é perceptível inclusive em monócitos e, eventualmente, em plaquetas.

No Quadro I está apresentada a casuística que serviu de base para a nossa investigação.

Os indivíduos normais, adultos, sofreram seleção puramente clínica. Os diagnósticos das infecções bacterianas decorreram de hemoculturas ou da existência de mais de 100.000 germes por ml de urina em cultivo bacteriológico quantitativo; no grupo das inadequadamente tratadas computamos as que evoluíram sem remissão das alterações de caráter infeccioso, ao contrário das debeladas categoricamente por terapêutica correta, confor-

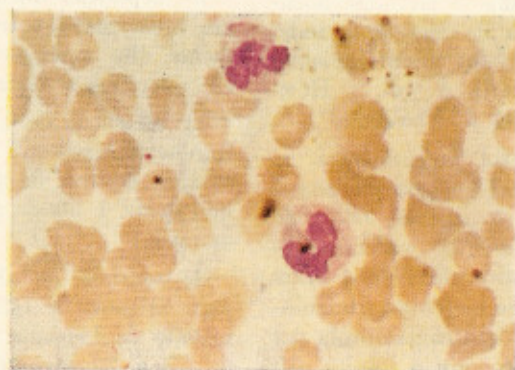
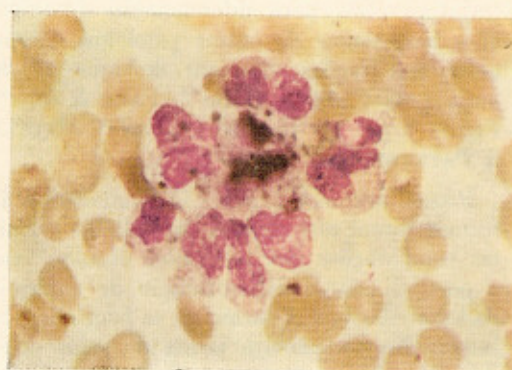
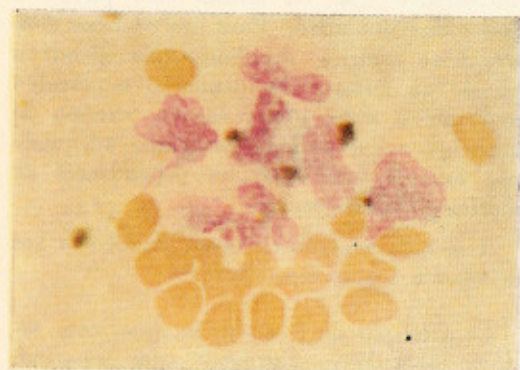


Fig. 1 — Neutrófilos "nitroblue tetrazolium" - positivos.

QUADRO I

Observações de caráter diagnóstico relativas ao teste do "nitroblue tetrazolium":
casuística analisada

Indivíduos normais e afecções consideradas	Números de casos
Indivíduos normais (sexo masculino: 21; sexo feminino: 14)	35
Infecções bacterianas (septicemia: 17; pielonefrite aguda: 13; febre tifóide: 9; endocardite bacteriana: 8)	47
Infecções bacterianas adequadamente tratadas	24
Infecções bacterianas inadequadamente tratadas	12
Doenças granulomatosas (blastomicose sul-americana, hanseníase e tuberculose)	12
Viroses (caxumba, hepatite por vírus e sarampo)	19
Tumores epiteliais malignos, em geral com metástases	8
Doença de Hodgkin	6
Lupus eritematoso sistêmico	6

me documentação advinda da observância de diversos parâmetros. As demais enfermidades, seguramente definidas e não associadas a outras, estavam ainda em etapa prévia a combate por procedimentos de quaisquer ordens.

Para a estimativa estatística recorreremos aos contrastes de SHEFFÉ²² e valemo-nos de computador "Hewlett Packard 9810A" com plano de fábrica; servimo-nos outrossim de programa indicado pelo Departamento de Epidemiologia, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, e adotamos como significativos os valores de p superiores a 99%, tendo alguns entre eles, assinalados, atingido até 99,95%.

RESULTADOS

Todas as nossas constatações encontram-se nos Quadros II e III.

As porcentagens presentes no primeiro e segundo itens do Quadro II são ressaltáveis no conjunto de números que estabelecemos. Em labores rotineiros, devidamente rememoradas, elas mostrar-se-ão aptas, indiscutivelmente, a cooperar para o desvendamento de questões que exigem definições finais acerca de suas naturezas.

QUADRO II

Observações de caráter diagnóstico relativas ao teste do "nitroblue tetrazolium":
resultados obtidos

Indivíduos normais e afecções consideradas	Resultados obtidos (%)	Médias (%)
Indivíduos normais	2 a 17	7,2
Infecções bacterianas	18 a 90	41,1
Infecções bacterianas adequadamente tratadas	2 a 23	10,5
Infecções bacterianas inadequadamente tratadas	16 a 67	28,3
Doenças granulomatosas	2 a 46	17,5
Viroses	3 a 24	12,4
Tumores	3 a 12	5,6
Doença de Hodgkin	3 a 12	7,1
Lupus eritematoso sistêmico	2 a 9	4,0

QUADRO III

Observações de caráter diagnóstico relativas ao teste do "nitroblue tetrazolium":
análise estatística dos resultados obtidos

Indivíduos normais e afecções consideradas	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉
X ₁ Indivíduos normais	—	-0,0297	-1,0253	0,3488	-11,8699**	-0,9690	-2,3825	-4,8481*	0,4871
X ₂ Doença de Hodgkin	—	—	-0,5957	0,2773	-6,0909**	0,5314	1,5686	3,2190	1,0212
X ₃ Víroses	—	—	—	1,0175	-8,6904**	0,1186	-1,3709	-3,6097	1,0833
X ₄ Tumores	—	—	—	—	-7,2963**	-0,9609	-2,0466	-3,8547	0,1454
X ₅ Infecções bacterianas	—	—	—	—	—	9,5554**	5,7413**	3,1896	6,6175**
X ₆ Infecções bacterianas adequadamente tratadas	—	—	—	—	—	—	-1,5320	-3,8658	1,0316
X ₇ Doenças granulomatosas	—	—	—	—	—	—	—	-2,0216	2,0252
X ₈ Infecções bacterianas inadequadamente tratadas	—	—	—	—	—	—	—	—	3,6757
X ₉ Lupus eritematoso sistêmico	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Matriz de contrastes de Scheffé $x_1 = \text{arcsen } \% F_c = \pm 4,6819$ $p < 0,005^*$ $F_c = \pm 5,1147$ $p < 0,0001^{**}$

DISCUSSÃO

As nossas verificações permitem, acreditamos, consignar as considerações a seguir expostas.

1) A utilidade do teste do "nitroblue tetrazolium" no sentido de prestar auxílio ao diagnóstico diferencial entre vários tipos de enfermidades ficou patente e a presunção de que problema em fase de apreciação é de natureza bacteriana pode, com margem de segurança destacável, ser estabelecida, convido não esquecer que há necessidade de separar a tuberculose quando tal interpretação recebe devida valorização, sendo que essa doença, no presente estudo, foi incluída no grupo das moléstias granulomatosas.

2) A técnica adotada, simples, de execução rápida e não totalmente idêntica à proposta por PARK & col.¹⁶, de certa forma alterou os limites aceitos como normais. Não houve, porém, mudança do valor da prova pelo menos quanto à viabilidade de separação de processos mórbidos causados por bactérias de outros, relacionados em diferentes grupos e não distinguíveis entre si pela realização da mesma. Convém frisar que o discernimento concernente às modalidades de distúrbios granulomatosos tem provocado opiniões conflitantes (MANDELL & FULLER¹¹).

3) Como praticado por nós, o exame não informou com precisão acerca dos eficientes ou insatisfatórios tratamentos recomendados, embora quase tenhamos demarcado significância estatística no que diz respeito a esse aspecto. Novas pesquisas, fundamentadas, por exemplo, em mais amplas raias de tolerância e em maior número de casos, talvez mudem essa conclusão, prestando almejado serviço de caráter elucidativo.

4) Particularidade digna de relevo corresponde à falta de correlação que notamos relativamente a valores documentados e extensão ou gravidade dos comprometimentos orgânicos.

5) Os níveis estatísticos apurados afiguraram-se mais satisfatórios quando expressos em percentuais e não em cifras absolutas os resultados das determinações, refletindo de novo o conhecimento de que a leucocitose e a neutrofilia possuem, isoladamente, modesto papel discriminatório.

6) A excepcionalidade de resultados não coadunáveis com participações bacterianas não deve ser olvidada, surgindo como prerrogativa ainda mais saliente se a simplicidade alusiva ao teste for focalizada.

7) A existência de febre, de calafrios e de leucocitose ou leucopenia, a extensão e gravidade do processo infeccioso e, por fim, o período de tempo de evolução sem tratamento, não mantiveram conexão com os dados agora comunicados, de acordo com nossas estimativas não detalhadas na presente explanação.

Neste item lembramos que não sabemos cientificar se a retirada do sangue precisa suceder estando em jejum os enfermos implicados.

8) Reatividade diminuída, motivada pelo lupus eritematoso sistêmico, parece acontecer (DOUWES⁴); entretanto, como não abordamos número suficiente de casos dessa mesenquimopatia, preferimos deixar de opinar a respeito.

9) Os méritos inerentes ao recurso laboratorial no momento focalizado estão, evidentemente, cristalizados e expressos, pelo menos em parte, pelos informes por nós apresentados. Como complemento do que já ficou investigado, é imperioso aumentar as observações especulativas, doutrinárias e diagnósticas com ele ligadas e, ainda, procurar utilizá-lo amplamente no terreno da febre de origem indeterminada. Por fim, torna-se impreterível tentar desvendar o comportamento dele no setor das doenças transmissíveis e, em particular, das patologias regionais de diferentes países.

SUMMARY

The nitroblue tetrazolium test as a diagnostic tool

The nitroblue tetrazolium test, which was standardized by one of us (J.P.), has been investigated in normal individuals, in cases of bacterial infections including adequately and inadequately treated patients, in cases of granulomatous and viral diseases, malignant tumors, Hodgkin disease and disseminated lupus erythematosus.

As a basic statement, the test in question is a valuable weapon to inform whether a given disease is presumably bacterial in nature and a satisfactory course occurred after adequate treatment. The above facts can be of value in establishing the diagnosis of different kinds of illnesses.

The Authors have stressed the need to enhance investigational efforts related to such test and to increase its use in cases of fevers of unknown origin, as well as in the field of communicable diseases and regional pathology of different countries.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAEHNER, R.L. & NATHAN, D.G. — Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* 278:971-976, 1968.
2. BERENDS, H.; BRIDGES, R.A. & GOOD, R.A. — A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minnesota Med.* 40:309-312, 1957.
3. COCCHI, P.; MORI, S. & BECATTINI, A. — N.B.T. tests in premature infants. *Lancet* 2:1426-1427, 1969.
4. DOUWES, F.R. — Clinical value of NBT test. *N. Engl. J. Med.* 287:822, 1972.
5. FEIGIN, R.D.; SHACKELFORD, P.G. & CHOI, S.C. — Prospective use of the nitroblue tetrazolium dye test in febrile disorders. *J. Pediat.* 79:943-947, 1971.
6. FEIGIN, R.D.; SHACKELFORD, P.G.; CHOI, S.C.; FLAKE, K.K.; FRANKLIN Jr., F.A. & EISENBERG, C.S. — Nitroblue tetrazolium dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. *J. Pediat.* 78:230-237, 1971.
7. HOLMES, B.; PAGE, A.R. & GOOD, R.A. — Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.* 46:1422-1432, 1967.
8. HOLMES, B.; QUIE, P.G.; WINDHORST, D.B. & GOOD, R.A. — Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet* 1:1225-1228, 1966.
9. HUMBERT, J.R.; MARKS, M.I.; HATHAWAY, W.E. & THOREN, C.H. — The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infections. *Pediatrics* 48:259-267, 1971.
10. LIAKAKOS, D. & VLACHOS, P. — NBT test in thalassemia. *J. Pediat.* 82:352-353, 1973.
11. MANDELL, G.L. & FULLER, L.F. — Nitroblue tetrazolium dye test: a diagnostic aid in tuberculosis. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 105:123-125, 1972.
12. MATULA, G. & PATERSON, P.Y. — Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. *N. Engl. J. Med.* 285:311-317, 1971.
13. MIESCHER, P.A. & LAMBERT, H. — L'apport du test au N.B.T. dans le diagnostic des états inflammatoires. *Praxis* 61:335-336, 1972.
14. PARK, B.H. — Comunicação pessoal a um dos autores (J.P.).
15. PARK, B.H. — The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. *J. Pediat.* 78:376-378, 1971.
16. PARK, B.H.; FIKRIG, S.M. & SMITHWICK, E.M. — Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. *Lancet* 2:532-534, 1968.
17. PARK, B.H. & GOOD, R.A. — N.B.T. test stimulated. *Lancet* 2:616, 1970.
18. PARK, B.H.; HOLMES, B.M.; RODEY, G.E. & GOOD, R.A. — Nitroblue-tetrazolium test in children with fatal granulomatous disease and newborn infants. *Lancet* 1:157, 1969.
19. PARK, B.H.; SOUTH, M.A.; BARRETT, F.F.; MONTGOMERY, J.R.; HEIM, L. & GOOD, R.A. — The use of the nitroblue tetrazolium reduction (NBT) test in diagnosis and treatment of bacterial endocarditis. *Pediat. Res.* 4:463, 1970.
20. PASTERNAK, J. — *Padronização e estudo da utilidade clínica do teste do nitroblue-tetrazolium*. Tese. Campinas, Fac. Ci. Méd. Univ. Estadual Campinas, 1973.
21. PIETU, R. & GERNIERS, M.M. — Le test de réduction du nitrobleu de tetrazolium. Valeur spécifique pour le diagnostic de granulomatose familiale létale. *Nouv. Rev. Franc. Hémat.* 9:401-408, 1969.
22. SCHEFFÉ, H.A. — A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika* 40:87-104, 1953.

Recebido para publicação em 31/1/1974.