

REDUÇÃO DO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) E RESULTADOS FALSO-POSITIVOS: ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA E DOENÇA DE CHAGAS

Tsutomu HIGASHI (1), José Luís da Silveira BALDY (2), José Frutos OLIVERA (1), Luiz Carlos BERTONI (3), Lucio Masahiro Kanayama OBA (3), Mario SEKI (4), Raimundo Nonato TEIXEIRA (4) e Júlio Takeuki HIGASHI (4)

RESUMO

Os Autores estudaram a redução do "Nitroblue Tetrazolium" (NBT) por neutrófilos, utilizando a técnica citoquímica de execução rápida recomendada por PARK & col.^{15, 16}, em 55 indivíduos, distribuídos em quatro grupos: indivíduos normais, com parasitoses intestinais (associadas), com doença de Chagas e com esquistossomose mansônica (fase crônica). Demonstraram aumento significativo de redução do NBT no grupo com esquistossomose mansônica, incluindo essa doença no conjunto das entidades que determinam resultados "falso-positivos" (aumento de redução do NBT em processos não bacterianos), sugerindo que o NBT isoladamente não constitui índice seguro e útil para o diagnóstico de infecção bacteriana em nosso meio, devido à alta prevalência dessa helmintíase em nosso País.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de exames de laboratório que permitem diagnóstico rápido e preciso de doenças infecciosas e parasitárias representa frequentemente, em relação a muitas emergências médicas, o fator decisivo para o estabelecimento precoce da terapêutica específica, e conseqüente melhora do prognóstico.

PARK & col.¹⁵ verificaram que a redução do "Nitroblue Tetrazolium" (NBT) ocorria com freqüência significativamente maior em crianças com infecções bacterianas do que no grupo controle; HUMBERT¹², WOLMAN & col.²⁴ e, em nosso meio, PASTERNAK¹⁷ e HIGASHI¹⁰ encontraram resultados concordantes com os de PARK & col.¹⁵ em relação a processos infecciosos. Anteriormente,

BAEHNER & NATHAN^{4, 14} tinham observado a incapacidade de neutrófilos de crianças com doença granulomatosa crônica reduzirem o NBT.

Resultados falso-positivos (redução do NBT aumentada em doenças não bacterianas) foram observados por diversos Autores^{3, 5, 7, 9, 12, 15} e resultados falso-negativos também se encontram referidos na literatura¹².

BITTNER & col.⁵ concluíram de suas observações que o significado do aumento na redução do NBT pelos neutrófilos corresponderia ao aumento da temperatura, da velocidade de hemossedimentação e do número de neutrófilos nos processos infecciosos, não se constituindo portanto, em exame de alta especificidade.

- Trabalho realizado no BIOPAR — Instituto Paranaense de Patologia Clínica, Londrina, Paraná
- (1) Auxiliar de ensino da Disciplina de Patologia Aplicada (Departamento de Patologia Clínica) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, Paraná
 - (2) Professor-Titular da Disciplina de Doenças Transmissíveis (Departamento de Medicina Geral e Saúde Comunitária) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, Paraná
 - (3) Biomédico do BIOPAR
 - (4) Acadêmico de Medicina da Universidade Estadual de Londrina, Paraná

Tendo sido descritas várias doenças não bacterianas associadas com aumento de redução do NBT (resultados falso-positivos), propusemo-nos a estudar o comportamento desse teste em parasitoses intestinais (associadas), na doença de Chagas (fase crônica) e na esquistossomose mansônica (fase crônica), com o objetivo de contribuir ao conhecimento de sua aplicação em nosso meio.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Todos os casos estudados foram submetidos a interrogatório e exame clínico, preenchendo-se para cada paciente, uma ficha-roteiro, com o objetivo de afastar a ocorrência concomitante de doença infecciosa aguda de qualquer natureza.

Os 55 indivíduos foram divididos em quatro grupos: a) Grupo A₀ — Grupo controle, constituído por indivíduos clinicamente hígidos e que, do ponto de vista laboratorial, apresentavam-se isentos de parasitose intestinal (três exames parasitológicos de fezes pelos métodos de Willis, Hoffman, Faust, Rugai e direto, efetuados com intervalo mínimo de sete dias^{1, 2, 19, 20}), leucograma normal²³, fixação de complemento para doença de Chagas com títulos dentro dos limites da normalidade^{21, 22}, imunofluorescência indireta para doença de Chagas “não reagente”⁶ e fixação de complemento para esquistossomose mansônica com títulos dentro dos limites da normalidade^{13, 18, 21, 22}. De acordo com esses critérios, foram reunidos nesse grupo dez casos de indivíduos de ambos os sexos, com idade compreendida entre 20 a 47 anos; b) Grupo B₁ — *Parasitoses intestinais (associadas)*, sendo similares suas características às do grupo controle, exceto ao exame parasitológico de fezes, positivo para ovos ou larvas ou cistos dos seguintes parasitas intestinais: *Ascaris lumbricoides*, *Giardia lamblia*, *Hymenolepis nana* e ancilostomídeos, não se encontrando ovos de *Schistosoma mansoni*^{1, 2, 19, 20}. Este grupo foi constituído de 11 casos de indivíduos de ambos os sexos, com idade variando de 17 a 42 anos; c) Grupo B₂ — *Doença de Chagas (fase crônica)*, com caracterização estabele-

cida através do critério imunobiológico (imunofluorescência indireta “reagente”)⁶ e fixação de complemento com título significativo para a doença^{21, 22}. Dentre pacientes deste grupo — constituído de 12 indivíduos de ambos os sexos, com idade compreendida entre 33 a 57 anos, procedentes de regiões endêmicas da doença de Chagas¹⁹ — alguns apresentavam manifestações clínicas decorrentes da cardiopatia chagásica; d) Grupo B₃ — *Esquistossomose mansônica (fase crônica)*, constituída por 22 casos com diagnóstico de esquistossomose mansônica (forma hepatintestinal da fase crônica), confirmado pelo achado de ovos do parasita ao exame parasitológico de fezes^{1, 2, 19, 20}. Os componentes deste grupo, pacientes de ambos os sexos, apresentavam idade compreendida entre 15 a 52 anos.

MÉTODOS

A coleta do material dos 55 casos estudados obedeceu às recomendações de PARK & col.¹⁵ e o método utilizado para análise da redução do NBT pelos neutrófilos seguiu a padronização desses Autores¹⁵. Foi utilizado NBT Sigma 0,1% em solução salina e tampão fosfato pH 7,2 com glicose. Pipetavam-se em partes iguais, num tubo de ensaio padronizado, 0,1 ml de NBT 0,1%, 0,1 ml de tampão fosfato e 0,2 ml de sangue heparinizado. A mistura era em seguida agitada levemente e incubada por período de 15 minutos, segundo recomendações de PASTERNAK¹⁷ em banho-maria a 37°C. Após a incubação realizavam-se esfregaços em lâminas, fixados com etanol por período de dez minutos. Após a fixação, as lâminas eram coradas com Giemsa, lavando-se 15 minutos depois em água corrente; uma vez secas, procedia-se à leitura da redução do NBT em microscópico óptico da Nikon, com aumento de 1.000 vezes. O aspecto obtido quando a redução de NBT era positivo está ilustrado na Fig. 1.

Contavam-se 100 neutrófilos para obter-se a porcentagem de redução do NBT. Para diminuir o coeficiente de variação e a influência subjetiva do observador, foram realizadas para cada lâmina, três contagens por



Fig. 1 — Aspecto de um neutrófilo com redução de NBT positiva.

três diferentes Autores, que não conheciam o diagnóstico no momento do exame. Para o resultado final foram utilizadas as médias aritméticas dos resultados obtidos.

RESULTADOS

Análise das porcentagens do aumento da redução do NBT dos grupos estudados em relação ao grupo controle

Os valores das porcentagens dos neutrófilos com redução do NBT em quatro grupos: A₀, B₁, B₂ e B₃ estão expressos na Tabela I.

Utilizou-se como intervalo de dispersão real do grupo controle de 3% a 14% na redução de NBT como faixa normal, e foram distribuídos os valores dos grupos B₁, B₂ e B₃ (Fig. 2).

Observou-se no grupo B₁ aumento de redução do NBT por neutrófilos em um dos 11 casos, o que corresponde a 9,09%. Nos 12 casos do grupo B₂ houve aumento da redução do NBT em sete casos, ou seja, em 58,33% e nos 22 casos do grupo B₃ verificou-se aumento da redução em 19 casos, correspondente a 86,3% (Fig. 3).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se análise de variância, com duas variáveis, envolvendo comparação entre médias de duas médias e calculou-se a oscilação crítica de Tukey. A comparação de contraste ortogonais entre médias múltiplas demonstrou a ocorrência de diferença significativa em nível de significância $p = 0,05$, entre grupo controle A₀ e o grupo B₃ (esquistossomose mansônica). Não houve alteração significativa de redução entre os demais grupos (Tabela II).

DISCUSSÃO

O NBT foi utilizado pioneiramente por PARK & col.¹⁵ como teste capaz de discriminar doença causada por bactérias de infecções de outra natureza; a ocorrência de resultados falso-positivos, ou seja, aumento da redução do NBT em processos não-bacterianos, tem sido referida em várias publicações^{3, 5, 7, 9, 11, 15, 16}.

BITTNER & col.⁵, estudando 141 casos distribuídos em quatro grupos (indivíduos nos

TABELA I

Valores porcentuais da redução do NBT por neutrófilos nos grupos: controle, parasitoses intestinais (associadas), doença de Chagas (fase crônica) e esquistossomose mansônica (fase crônica)

| Grupo A ₀ | Grupo B ₁ | Grupo B ₂ | Grupo B ₃ |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 12 | 14 | 7 | 38 |
| 9 | 5 | 15 | 16 |
| 7 | 4 | 11 | 35 |
| 6 | 9 | 11 | 49 |
| 3 | 11 | 16 | 3 |
| 14 | 8 | 26 | 36 |
| 6 | 10 | 38 | 25 |
| 12 | 8 | 22 | 48 |
| 10 | 11 | 27 | 33 |
| 5 | 17 | 30 | 13 |
| | 8 | 13 | 18 |
| | | 3 | 30 |
| | | | 19 |
| | | | 27 |
| | | | 20 |
| | | | 17 |
| | | | 25 |
| | | | 15 |
| | | | 15 |
| | | | 17 |
| | | | 15 |
| | | | 14 |

Grupo A₀: Controle
 Grupo B₁: Parasitoses intestinais (associadas)
 Grupo B₂: Doença de Chagas (fase crônica)
 Grupo B₃: Esquistossomose mansônica (fase crônica)

mais, doentes com infecção bacteriana, doentes com infecção não bacteriana e doentes com moléstias não infecciosas), concluíram que a contribuição do NBT para o diagnóstico das doenças bacterianas é comparável

às da análise da piroxia e às informações do leucograma e da velocidade de hemossedimentação.

O teste da redução do NBT poderá ser útil na prática médica, desde que analisado em conjunto com outros índices de infecção bacteriana. Entretanto, a interpretação dos resultados obtidos com a redução do NBT em nosso meio deve ser muito cuidadosa, em vista dos resultados "falso-positivos" observados na esquistossomose mansônica, conforme demonstramos, fato que limita o significado da informação fornecida por este nas emergências médicas.

Em relação à doença de Chagas (fase crônica), o número de casos que estudamos foi muito pequeno para conclusões definitivas, estatisticamente significativas; observamos, no entanto, aumento da redução do NBT em sete (58,3%) dos 12 casos estudados. Esse resultado sugere a necessidade de uma análise com casuística maior, para que se possa também incluir a doença de Chagas entre as entidades responsáveis por resultados falso-positivos do teste de redução do NBT.

SUMMARY

Reduction of Nitroblue Tetrazolium (NBT) and results false-positive: Bilharziosis and Trypanosomiasis

The Authors studied the reduction of Nitroblue Tetrazolium (NBT) by neutrophils according to the citochemistry method of rapid performance, as described by PARK et al.^{15, 16} in 55 persons distributed in four classes: control group, intestinal parasitoses, Trypanosomiasis and Bilharziosis.

They demonstrated that in the Bilharziosis Group the reduction of NBT was significantly increased, including this parasitosis in those entities yielding false-positive results (increased NBT reduction not in acute bacterial infection), suggesting that NBT test alone is not a secure and useful index to diagnose bacterial infection in our country, due to the high incidence of this helminthiasis.

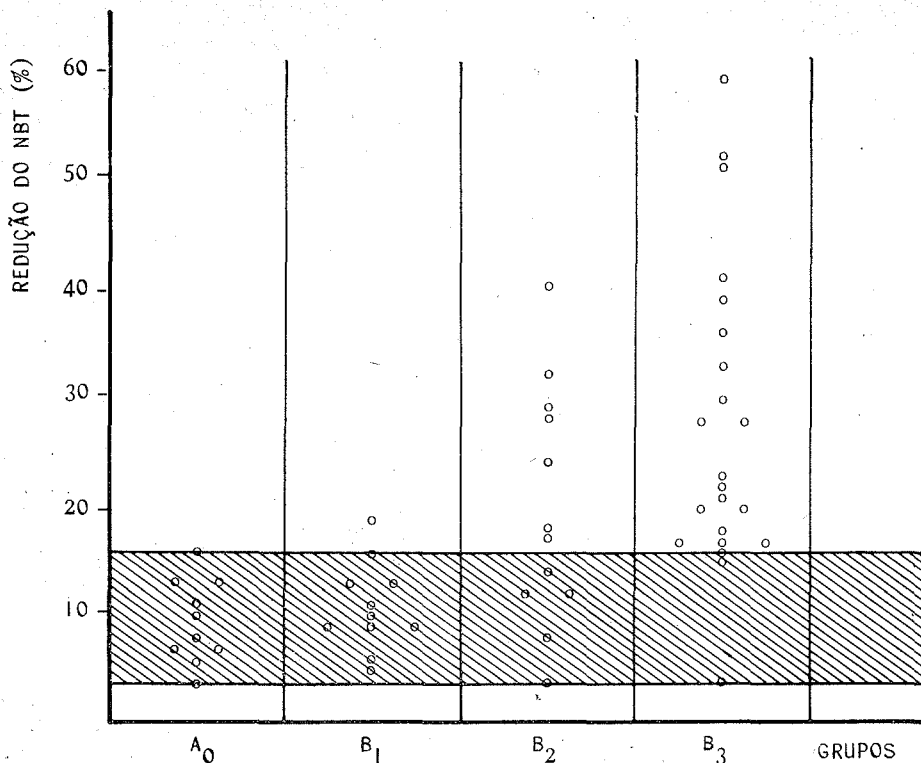


Fig. 2 — Distribuição dos valores da redução do NBT do grupo controle em confronto com os grupos das parasitoses intestinais (associadas), doença de Chagas (fase crônica) e esquistossomose mansônica (fase crônica). A₀: Grupo controle; B₁: Parasitoses intestinais (associadas); B₂: Doença de Chagas (fase crônica); B₃: Esquistossomose mansônica (fase crônica).

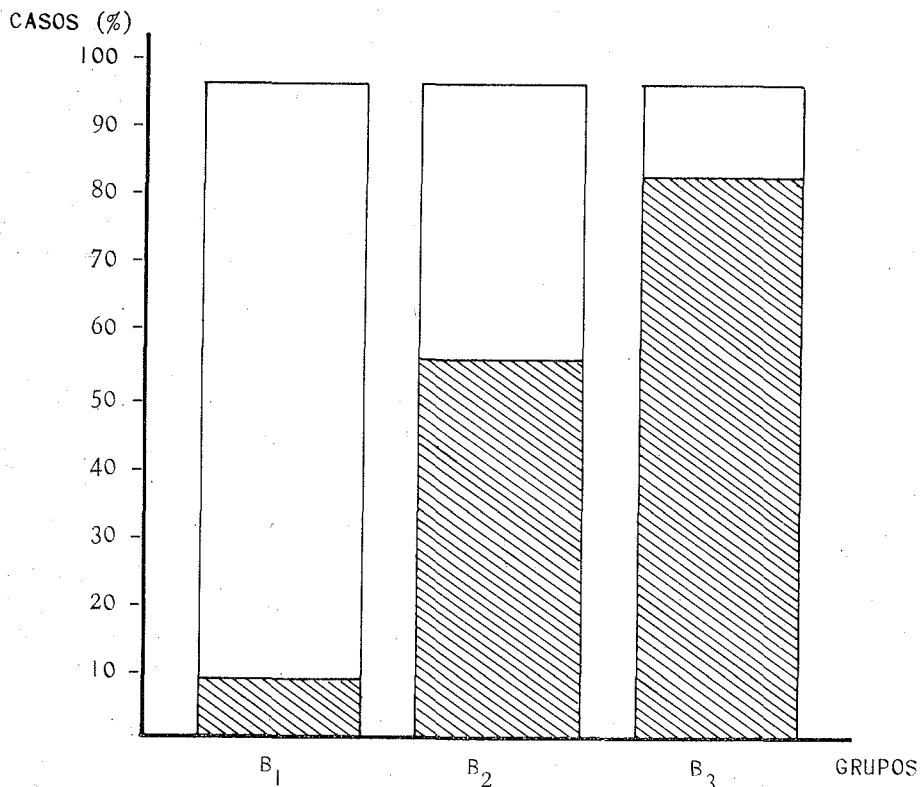


Fig. 3 — Porcentagem dos casos dos grupos com aumento da redução do NBT em confronto com o grupo controle. B₁: Parasitoses intestinais (associadas); B₂: Doença de Chagas (fase crônica); B₃: Esquistossomose mansônica (fase crônica).

HIGASHI, T.; BALDY, J. L. da S.; OLIVERA, J. F.; BERTONI, L. C.; OBA, L. M. K.; SEKI, M.; TEIXEIRA, R. N. & HIGASHI, J. T. — Redução do Nitroblue Tetrazolium (NBT) e resultados falso-positivos: esquistossomose mansônica e doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:276-282, 1976.

TABELA II

Confronto entre os grupos: controle, parasitoses intestinais (associadas), doença de Chagas (fase crônica) e esquistossomose mansônica (fase crônica)

| GRUPOS | % DE REDUÇÃO DE NBT (MÉDIAS) | CONTRASTES ORTOGONAIS SIGNIFICATIVOS | |
|----------------|------------------------------|---|--|
| | | p = 0,05 (OSCILAÇÃO CRÍTICA DE TUKEY = 15,5) | |
| A ₀ | 8,40 | | |
| B ₁ | 9,54 | | |
| B ₂ | 18,25 | | |
| B ₃ | 24,95 | | |

GRUPO A₀ - CONTROLE

GRUPO B₁ - PARASITOSE INTESTINAIS (ASSOCIADAS)

GRUPO B₂ - DOENÇA DE CHAGAS (FASE CRÔNICA)

GRUPO B₃ - ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA (FASE CRÔNICA)

* - CONFRONTO SIGNIFICATIVO

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO NETO, V.; CAMPOS, R. & FERREIRA, C.S. — *Diagnóstico de parasitoses intestinais pelo exame de fezes*. São Paulo, Fundo Editorial Prociencx, 1961.
- AMATO NETO, V.; CORREIA, M.O.A. & FLEURY, G.C. — Estudos sobre o valor do método de Rugai, Mattos e Brisola na pesquisa de larvas de Nematoides nas fezes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 17:33-38, 1957.
- ANDERSEN, B.R. — NBT test in malaria. *Lancet* 7:317, 1971.
- BAEHNER, R.L. & NATHAN, D.G. — Quantitative Nitroblue Tetrazolium test in the chronic granulomatous disease. *Eng. J. Med.* 278:971-980, 1968.
- BITTNER, S.J.; KIEFF, E.; WINDHORST, D. & MEIER, P. — The use of the unstimulated Nitroblue Tetrazolium test as a routine screening test for bacterial infection in an adult population. *Amer. J. Clin. Path.* 69:843-853, 1973.
- CAMARGO, M.E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Chagas' disease. Technical modification employing preserved cultural forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:227-234, 1966.
- CHRETIEN, J.H. & GARASUSI, V.F. — NBT test in parasitic disease. *Lancet* 4: 549, 1971.
- FISHER, R.A. & YATES, F. — *Tables Estatísticas*. Madrid, Aguilar Editions, 1954.
- GRUSH, O.C. & MANUER, A.M. — Neutrophil function and NBT dye reduction. *Lancet* 16:383, 1969.
- HIGASHI, T.; SEKI, M.; PINHEIRO, R.; OBA, M.K. & TEIXEIRA, R.N. — *Redução de Nitroblue Tetrazolium (NBT) e sua aplicação em Patologia Clínica*. Porto Alegre, II Congresso Latino Americano de Bioquímica Clínica, 1973.
- HUMBERT, J.R.; KURTZ, M.L. & WATHAWAY, W.E. — Nitroblue Tetrazolium Reduction by Neutrophils of newborn infants. *Pediatrics* 45:125-128, 1971.
- HUMBERT, J.R.; MARKS, M.L.; WATHAWAY, W.E. & THOREN, C.H. — Nitroblue Tetrazolium Reduction test in the differential diagnosis of acute infections. *Pediatrics* 48:259-267, 1971.

HIGASHI, T.; BALDY, J. L. da S.; OLIVERA, J. F.; BERTONI, L. C.; OBA, L. M. K.; SEKI, M.; TEIXEIRA, R. N. & HIGASHI, J. T. — Redução do Nitroblue Tetrazolium (NBT) e resultados falso-positivos: esquistossomose mansônica e doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:276-282, 1976.

13. KAGAN, I.G. & PELLEGRINO, J. — A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziosis. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 25:611-674, 1961.
14. NATHAN, D.G.; BAEHNER, R.L. & WEAVER, D.K. — Failure of Nitroblue Tetrazolium Reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 48:1895-1905, 1969.
15. PARK, B.H.; FIKRIB, S.M. & SMITHWICK, E.M. — Infection and Nitroblue Tetrazolium Reduction by neutrophils. *Lancet* 7:532-534, 1968.
16. PARK, B.H. — The use and limitations of the Nitroblue Tetrazolium test as a diagnostic aid. *Pediatrics* 78:376-378, 1971.
17. PASTERNAK, J. — *Padronização e estudo da utilidade clínica do teste do Nitroblue Tetrazolium*. [Tese]. Apresentada à Universidade Estadual de Campinas, 1973.
18. PELLEGRINO, J. — Diagnóstico de laboratório de esquistossomose mansônica — métodos imunológicos. *Rev. Brasil. Malariol. & Doenças Trop.* 11:507-551, 1959.
19. PESSÓA, S.B. — *Parasitologia Médica* — 7.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1967.
20. REY, L. — *Parasitologia*. 1.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1972.
21. WADSWORTH, R.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. *Immunol.* 21: 313-340, 1931.
22. WADSWORTH, A.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of the complement fixation reaction with syphilitic test. *Immunol.* 35:217-234, 1938.
23. WINTROBE, M.M. — *Clinical Hematology*. 6.ª ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1967.
24. WOLMAN, M.R.; BRENNAN, B.L.; DAVID, D.S.; LEWY, J.E.; STENZEL, K.H. & RUBIN, A.L. — The Nitroblue Tetrazolium test. Usefulness in detection bacterial infections in uraemic and immunosuppressed renal transplant patients. *Lancet* 12:289-292, 1972.

Recebido para publicação em 6/2/1975.