

Primera experiencia en Paraguay para determinación de valores de referencia por la técnica de dihidrorodamina (DHR) en la evaluación del estallido respiratorio de neutrófilos en niños sanos

First experience in Paraguay of reference values determination using the dihydrorhodamine (DHR) assay in the evaluation of the neutrophil respiratory burst in healthy children

Diana Sanabria ⁽¹⁾, Vivian Giménez ⁽¹⁾, María Mercedes Carpinelli ⁽¹⁾, Julio Rolón ⁽²⁾

RESUMEN

Introducción: La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por alteración en la funcionalidad de neutrófilos, fundamental para defensa contra infecciones en humanos. La prueba del nitroazul de tetrazolio (NBT) es útil para el diagnóstico, destacándose al presente las técnicas por citometría de flujo como la dihidrorodamina (DHR). **Objetivo:** Determinar el intervalo de valores de referencia para la técnica DHR en la evaluación del estallido respiratorio de neutrófilos en niños sanos. **Materiales y Métodos:** Estudio observacional descriptivo de corte transversal con componente analítico. Se incluyeron 54 niños aparentemente sanos, de ambos sexos y hasta 16 años de edad, que acudieron a la consulta para control general del estado de salud o motivo pre quirúrgico a los consultorios pediátricos del Hospital General Barrio Obrero, de julio a setiembre del 2013. La funcionalidad de neutrófilos se evaluó por las técnicas NBT y DHR. **Resultados:** Se observó valores de reducción del NBT superiores a 85% en todos los niños. El intervalo de referencia establecido para el índice de estimulación de neutrófilos (IE) por la técnica DHR fue de 22,5 a 60,4 con media de $35,9 \pm 10,1$. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los promedios del IE con los rangos etarios ($p=0,336$) ni el sexo ($p = 0,174$).

ABSTRACT

Introduction: Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a primary immunodeficiency characterized by an impaired neutrophil functionality, essential in humans for the defense against infections. The nitroblue tetrazolium test (NBT) is useful for diagnosis, standing out among currently applied flow cytometry techniques like the dihydrorhodamine test (DHR). **Objective:** To establish the range of reference values for the DHR assay in the evaluation of the neutrophil respiratory burst in healthy children. **Materials and Methods:** A descriptive cross-sectional observational study with an analytical component. Fifty four apparently healthy children who were under 16 years of age, that attended the pediatric consultation for a general health state check-up or pre-surgical reasons at the pediatric offices of the Barrio Obrero General Hospital, were included. Neutrophil functionality was evaluated by NBT and DHR techniques. **Results:** NBT reduction values above 85% were observed in all children. The reference range established for neutrophil stimulation index (SI) by the DHR assay was 22.5 to 60.4 with a mean of 35.9 ± 10.1 . Statistically significant differences were not found between the means of SI of age ranges ($p = 0.336$) nor sex ($p = 0.174$). **Conclusion:** The range of reference values established for the DHR assay in the evaluation of the neutrophil

1. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

2. Dirección General, Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Areguá, Paraguay.

Correspondencia: Dra. Diana Sanabria. E-mail: dianas54@hotmail.com

Recibido: 23/02/2016; Aceptado: 21/04/2016.

Los autores declaran que no existen conflictos de interés en el presente estudio

<http://dx.doi.org/10.18004/ped.2016.abril.33-38>

Conclusión: El intervalo de valores de referencia determinado para la técnica DHR en la evaluación del estallido respiratorio de neutrófilos en la población de niños sanos estudiada, difiere de los descritos en otras bibliografías, lo cual sugiere la importancia de establecer valores propios que contemplen las características de la población en estudio y la metodología de cada laboratorio.

Palabras clave: Dihidrorodamina, estallido respiratorio, neutrófilos, citometría de flujo, EGC.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por disminución o ausencia de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^-), debido a la expresión deficiente de alguno de los componentes del complejo enzimático NADPH oxidasa de los neutrófilos⁽¹⁾. Este proceso de formación de especies reactivas del oxígeno se denomina estallido respiratorio (ER) y constituye un mecanismo fundamental de defensa contra infecciones en humanos⁽²⁾. La incidencia de EGC se estima en 1/250.000 recién nacidos vivos, se manifiesta con una predisposición a infecciones severas y recurrentes, presentando dos patrones de herencia, uno de ellos ligado al cromosoma X (65% a 70% de los casos)⁽³⁾, y el otro patrón de herencia autosómica recesiva (25% a 30% de los casos)^(4,5). La progresión clínica de la enfermedad, así como el inicio de los síntomas y el pronóstico están determinados por el tipo de herencia^(6,7).

El diagnóstico de EGC se realiza demostrando ausencia o disminución de actividad de la NADPH oxidasa en neutrófilos, lo cual se consigue midiendo la producción de radicales libres de oxígeno generados en dichas células^(8,9). Una prueba comúnmente utilizada para este fin es la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), sin embargo en los últimos años han cobrado importancia las técnicas por citometría de flujo, como la oxidación de la dihidrorodamina (DHR), una prueba sencilla, sensible y de bajo costo que presenta varias ventajas como la de evaluar un mayor número de células y determinar el patrón de herencia en el paciente afectado^(10,11).

El Instituto de Investigaciones en Ciencias de la

respiratory burst in the studied healthy children population differs from others found in literature. This shows the importance of establishing values that consider the characteristics of the study population and the methodology of each laboratory.

Keywords: Dihydrorhodamine, respiratory burst, neutrophils, flow cytometry, CGD.

Salud (IICS) es el único centro del país donde se realiza la prueba del NBT, y recientemente se llevó a cabo la estandarización de la técnica DHR. Como parte de dicho proceso se realizó este estudio, considerando que otros autores han determinado y reportado intervalos de referencia diferentes para la mencionada técnica, motivo por el cual destacan la importancia de establecer valores propios⁽¹⁰⁻¹³⁾. Además, la interpretación de un resultado de laboratorio es un proceso de comparación que permite la toma de decisiones diagnósticas y terapéuticas, por lo que es fundamental contar con valores que contemplen características metodológicas y de la población en estudio⁽¹⁰⁾. Por los motivos expuestos, el objetivo de este trabajo fue determinar el intervalo de valores de referencia para la técnica DHR en la evaluación del estallido respiratorio de neutrófilos en niños sanos de nuestra población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: Observacional descriptivo de corte transversal con componente analítico.

Población estudiada: Niños aparentemente sanos, de ambos sexos y hasta 16 años de edad, que acudieron a consulta pediátrica del Hospital General Barrio Obrero, de julio a setiembre de 2013.

Selección de los sujetos de referencia: Para la inclusión de individuos de referencia se consideró el mínimo de 39 sujetos como tamaño de muestra y las condiciones generales planteadas en las guías para determinación de intervalos de referencia C28-A2 y C28-A3 de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de la IFCC (International

Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). Los niños aparentemente sanos fueron seleccionados mediante evaluación clínica realizada por el pediatra, seguidamente, la aplicación de un cuestionario permitió incluir a quienes refirieron como motivo de consulta control general del estado de salud o pre-quirúrgico, así como buen estado general de salud los siete días previos a la toma de muestra. Se excluyeron a los que refirieron fiebre, resfríos, infecciones, enfermedad inmunológica y/o hematológica, así como consumo de antibiótico, analgésico, antigripal hasta siete días previos al análisis, además de hospitalización hasta tres meses previos. Otro criterio de exclusión fue el resultado en la prueba del NBT, técnica empleada actualmente en el laboratorio para medir funcionalidad de neutrófilos, prosiguiendo con el estudio aquellas muestras con valores en el rango considerado de referencia.

Obtención de muestras sanguíneas: Se extrajo a cada participante 1 ml de sangre venosa, recolectado en tubo con EDTA, el cual fue transportado a temperatura ambiente y la muestra procesada dentro de las tres horas en el Departamento de Inmunología del IICS.

Evaluación del ER de neutrófilos por la técnica NBT: La determinación fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Acosta y col⁽¹⁰⁾. Se dispuso 50 ul de sangre en tubos etiquetados como estimulado (E) y no estimulado (NE). Al tubo NE se agregó 50 ul de solución NBT, que se preparó disolviendo 0.002 mg del reactivo NBT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en 1 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS). Al tubo E se agregó 50 ul de solución NBT con activador Phorbol-miristato-acetato (PMA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), el cual se preparó mezclando 250 ul de solución NBT y 1 ul de PMA. Se incubaron ambos tubos en baño a 37 °C por 3 minutos. Por último se prepararon dos extendidos de cada tubo, fijándolos en metanol por 3 minutos para teñirlos con colorante Giemsa diluido 1:5 por 12 minutos. Se examinaron 100 células por microscopía óptica (100X), diferenciando aquellas con precipitado azul en su citoplasma. Se consideró como valor de referencia $\geq 85\%$ de neutrófilos activados⁽¹⁰⁾.

Evaluación del ER de neutrófilos por la técnica DHR: El ensayo estuvo basado en el protocolo de trabajo de Acosta y col⁽¹⁰⁾. Se dispuso 100 ul de sangre en tubo

de plástico, agregando 4 ml de buffer de lisis NH_4Cl 0.83g%. Luego de 3 minutos, se centrifugó a 1400 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante, se lavó el pellet con 3 ml de PBS y se resuspendieron las células con 1 ml de PBS. Se etiquetaron dos tubos de citómetro como E y NE, en cada uno se agregó 340 ul de la suspensión celular más 150 ul de solución DHR (Invitrogen, Oregon, USA). Ambos tubos se incubaron 5 minutos en baño a 37 °C para agregar luego 150 ul de solución PMA al tubo E y 150 ul de PBS al tubo NE. Ambos tubos fueron incubados 15 minutos a 37 °C, luego fueron analizados inmediatamente en el citómetro de flujo FacsCalibur de Beckton Dickinson (San José CA, USA) empleando el software CellQuest para la adquisición de los datos. Para expresar los resultados de la prueba DHR se empleó el índice de estimulación de neutrófilos (IE), calculado dividiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) del tubo E y la IMF del tubo NE⁽¹⁰⁾.

Asuntos éticos: La participación de cada niño fue autorizada por el responsable del menor mediante la firma de un consentimiento informado. El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CEI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA.

Análisis estadístico: Los datos fueron registrados en una hoja de cálculos del programa informático Microsoft Excel versión 8.0 y posteriormente analizados con el programa estadístico SPSS versión 11.5 para Windows. El intervalo de valores de referencia para el IE de neutrófilos se estableció empleando los percentiles 2.5 y 97.5. Se exploró además la relación de dicho parámetro con diferentes rangos etarios mediante la prueba ANOVA, y la relación con el sexo mediante la prueba t para muestras independientes, a un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 54 niños, de los cuales 29 (54%) fueron del sexo femenino. Respecto a la edad de los participantes, el promedio observado fue de 9 ± 5 años.

En todas las muestras evaluadas se encontró valores de reducción del NBT superiores a 85%, considerado como referencia y criterio de exclusión, por tanto

todas las muestras fueron analizadas por la técnica DHR, obteniéndose para el índice de estimulación de neutrófilos un promedio de $35,9 \pm 10,1$ y valores de intensidad de fluorescencia media en el rango de 165–323 para el ensayo estimulado (Tabla 1).

Tabla 1. Datos estadísticos para resultados de la prueba NBT, índice de estimulación de neutrófilos (IE) e intensidad de fluorescencia media (IFM). (n=54)

Determinación	Media \pm DS	Rango
% Reducción del NBT	96 ± 3	86 - 100
IE	$35,9 \pm 10,1$	21,8 - 61,3
IFM (NE)	7 ± 2	4 - 10
IFM (E)	244 ± 40	165 - 323

DS: desvío estándar; (NE): ensayo no estimulado; (E): ensayo estimulado.

En el análisis por la técnica DHR mediante citometría de flujo, se observó un importante desplazamiento del pico de fluorescencia cuando los neutrófilos son estimulados con PMA respecto al pico basal sin estimulación, dicho desplazamiento se corresponde con incrementos inferiores a dos logaritmos de la señal fluorescente (Figura 1).

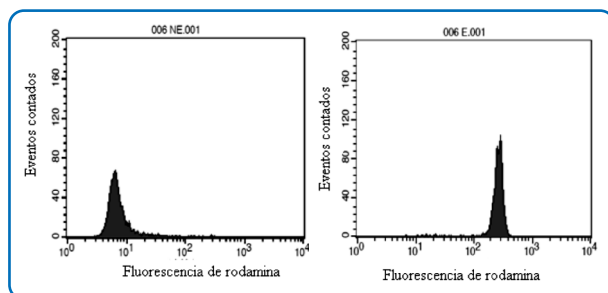


Figura 1. Resultado obtenido por citometría de flujo para la muestra N° 6. A la izquierda se presenta el pico basal de fluorescencia para el ensayo sin estimulación (NE), y a la derecha el pico de fluorescencia correspondiente al ensayo estimulado (E).

Se realizó un análisis estratificado por grupo etario y sexo. En la Figura 2 pueden observarse los promedios del IE de neutrófilos para cada grupo con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC_{95%}). En el grupo de 0 a 5 años el promedio fue de 39,1 (IC_{95%}=31,8–46,5), en los niños de 6 a 10 años se observó un promedio de 34,0 (IC_{95%}=29,3 - 38,8) y en el de 11 a 16 años fue de 35,0 (IC_{95%}=30,0–39,3). En los niños del sexo femenino y masculino los promedios fueron 34,2 (IC_{95%}=30,6–37,7) y 37,9 (IC_{95%}=33,5–42,3) respectivamente. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para los IE entre los diferentes grupos etarios (p=0,336), tampoco se observó tal diferencia en los individuos de distintos sexos (p=0,174).

Finalmente, se estableció el intervalo de referencia para el IE de neutrófilos por la técnica DHR empleando los percentiles 2,5 y 97,5 para determinar el valor mínimo y máximo respectivamente, dicho rango fue de 22,5 a 60,4.

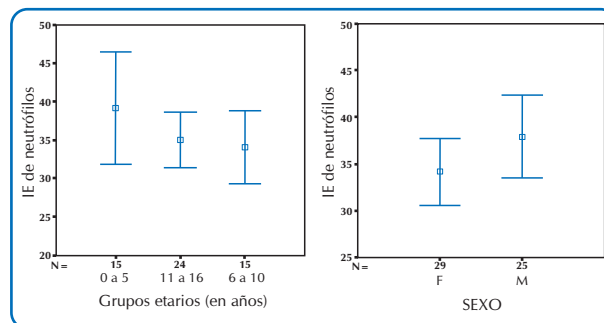


Figura 2. Índice de estimulación (IE) de neutrófilos para diferentes grupos etarios (izquierda) y los distintos sexos (derecha). El valor de la media está representado por el punto central sobre la línea vertical. La longitud de esta línea o barra de error, indica el intervalo de confianza (IC) al 95%. N: número de individuos en cada grupo; F: femenino; M: masculino.

DISCUSIÓN

Desde muchos años atrás, varios autores han reportado el uso de la técnica DHR por citometría de flujo para medir el estallido respiratorio de neutrófilos^(7,14,15). La dihidrorodamina fue utilizada por primera vez en el año 1988 como marcador fluorescente para evaluar funcionalidad de células fagocíticas⁽¹⁶⁾. Actualmente, dicha técnica se constituye en un examen rápido y sensible para el diagnóstico de EGC, además de ser una herramienta bastante útil para identificar patrones de herencia de la enfermedad, lo cual es muy importante de modo a brindar asesoramiento genético a la familia y orientar a las portadoras sobre posibles manifestaciones clínicas que pueden presentar a lo largo de su vida, como es el desarrollo de enfermedades autoinmunes^(8,9). Si bien esta técnica es utilizada en otros países hace más de una década, en ciudades vecinas como por ejemplo Córdoba-Argentina, tuvo su primera aplicación en el 2008 para el diagnóstico de casos de EGC⁽¹⁰⁾, mientras que en Paraguay la estandarización de la misma se inicia en el 2013 en el Departamento de Inmunología del IICS, proceso que culmina exitosamente con la realización de este estudio donde se ha determinado el intervalo de valores de referencia en una población de niños saludables.

En cuanto al análisis de las muestras por citometría de flujo, se observaron intensidades de fluorescencia media (IFM) entre 165 y 323 en el ensayo donde se estimularon los neutrófilos con PMA, estos valores se corresponden con desplazamientos inferiores a dos logaritmos de la señal fluorescente. Acosta y col⁽¹⁰⁾ reportaron similares desplazamientos de fluorescencia, en cambio Vowells y col⁽¹²⁾ obtuvieron un rango más elevado, alcanzando incrementos de dos logaritmos. Por otra parte, el rango de IFM obtenido por Rodríguez y col⁽¹³⁾ fue de 13,3 a 50,4 marcadamente inferior a lo observado en este trabajo.

El intervalo de referencia determinado en este estudio para el IE de neutrófilos fue de 22,5 a 60,4. Este rango puede considerarse bastante similar al establecido por Acosta y col⁽¹⁰⁾ que fue de 10,1 a 57,8, sin embargo cabe resaltar la diferencia observada en el límite inferior de ambos intervalos, puesto que los valores por debajo de este rango son los considerados patológicos y posibilitan el diagnóstico de EGC. Además, se observó una importante diferencia con el intervalo de 85,2 a 264,6 reportado por Vowells y col⁽¹²⁾, y con el intervalo de 72 a 212 que obtuvieron Rojas-Restrepo y col⁽¹¹⁾. Las diferencias observadas en los valores de IE obtenidos en otros laboratorios pueden estar relacionadas al tipo de citómetro empleado en la medición, a reactivos y condiciones de estandarización diferente, y a las características propias de la población estudiada^(10,11). Por tanto, se destaca la importancia y necesidad de que cada laboratorio que empieza a trabajar con el ensayo DHR establezca su propio intervalo de referencia para esta técnica.

En cuanto a la relación entre el IE de neutrófilos con

la edad y sexo de los pacientes, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos etarios, tampoco se observó dicha diferencia entre el sexo masculino y femenino, estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores^(10,17), por lo cual el intervalo de referencia establecido en este estudio puede emplearse en niños sanos de ambos sexos y de hasta 16 años de edad.

Finalmente, otro hallazgo no menos importante son los resultados de la prueba del NBT, si bien fueron utilizados como criterio de exclusión y se encontró para todas las muestras valores considerados normales según la bibliografía consultada⁽¹⁰⁾, en el Departamento de Inmunología del IICS no se contaba hasta la fecha con valores propios para la técnica, y mediante este trabajo puede establecerse en el rango de 86 a 100%.

CONCLUSIÓN

En la población de niños sanos estudiada se determinó un intervalo de valores de referencia para la técnica DHR que difiere de los hallados en otras literaturas, lo cual sugiere la importancia de establecer valores propios.

Con la realización de este estudio se concluyó el proceso de estandarización de la técnica DHR, la misma constituye un servicio innovador a nivel país puesto que el IICS es el primer y único centro del país donde se ha implementado, quedando así disponible como método de rutina para evaluar funcionalidad de neutrófilos y contribuir tanto al diagnóstico de EGC como a la detección del tipo de herencia de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*. 2005;89(7):1113-1121.
2. Cascales M. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anal Real Acad Nac Farm*. 2005;71:365-86.
3. Battersby AC, Cale CM, Goldblatt D, Gennery AR. Clinical manifestations of disease in X-Linked Carriers of Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol*. 2013;33:1276-1284.
4. Alvarez Cardona A, Yamazaki Nakashimada M, Espinosa Padilla S. Chronic granulomatous disease. *Rev Alerg Mex*. 2009;56:165-74.
5. Roos D, Kuhns D, Maddalena A. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44:291-99.
6. Van den Berg JM, Van KE, Ahlin A. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One*. 2009;4:e5234.

7. Soler Palacín P, Margareto C, Llobet P, Asensio O, Hernández M, Caragol I. Chronic granulomatous disease in pediatric patients: 25 years of experience. *Allergol et Immunopathol.* 2007;35(3):83-89.
8. Ramírez Vargas N, Berrón Ruiz L, Berrón Pérez R, Blancas Galicia L. Diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica; pacientes y portadoras. *Rev Alergia Mex.* 2011;58(2):120-25.
9. Blancas-Galicia L, Espinosa-Padilla S, Espinosa-Rosales F. 1,2,3 dihidrorodamina, una técnica accesible y útil para la detección de pacientes y portadoras de enfermedad granulomatosa crónica. Experiencia en el Instituto Nacional de Pediatría. *Alergia e Inmunol Pediatr.* 2013;22(3):96-100.
10. Acosta C, Cassinerio A, Pereira MI, Mosca L. Determinación de valores de referencia para la técnica de oxidación de la dihidrorodamina 123 por citometría de flujo. *Alerg Inmunol Clin.* 2008;26(2-3):70-75.
11. Rojas-Restrepo JL, Álvarez-Álvarez JA, Montoya-Giraldo JD, Trujillo-Vargas CM. Validación de la técnica de dihidrorodamina 123 para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica en Colombia. *Inmulología.* 2014;33(3):71-80.
12. Vowells SJ, Fleisher TA, Sekhsaria S, Alling DW, Maguire TE, Malech HL. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr.* 1996;128(1):104-7.
13. Rodríguez F, Carrión F, Valenzuela S, Suazo F. Determinación de estallido respiratorio en sangre total mediante la técnica de citometría de flujo. *Rev Chil Tecnol Med.* 2004;24(2):1141-1146.
14. Campos P, Opazo N, Castillo JL. 123 Dihidrorodamina en la evaluación de estallido respiratorio mediante citometría de flujo. *Rev Latinoam Actual Bioméd.* 2007;1(1):17-21.
15. Castillo JL, Venegas O, Pereira P, Ibacache M. Evaluación del estallido respiratorio en granulocitos de pacientes con alteraciones clínicas de la función fagocítica. *Rev Latinoam Actual Bioméd.* 2008;1(2):26-30.
16. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihidrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity for neutrophils granulocytes. *Naturwissenschaften.* 1988;75:354-55.
17. Emmendorffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry.* 1994;18:174-55.