

NEUTRÓFILO BASTONETE TEM CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO BACTERIANA AGUDA?

HAS THE BAND NEUTROPHIL A GOOD CORRELATION WITH AN ACUTE BACTERIAL INFECTION?

Deborah Pagnussat FERRAZZI¹; Paulo Henrique da SILVA²; Railson HENNEBERG²

1-Aluna de pós-graduação do curso de Hematologia Laboratorial da Pontífice Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); 80530-320; Curitiba – Paraná – Brasil

2-Docente do Departamento de Análises Clínicas; Universidade Federal do Paraná. Email: railson@ufpr.br

RESUMO:

A contagem de granulócitos imaturos cada vez mais vem ganhando espaço na rotina laboratorial no diagnóstico de infecção bacteriana. Isso deve-se ao fato dela ser mais específica que a contagem de bastonetes, atualmente utilizada na prática clínica. Mas apesar de ser um potente indicador de infecção bacteriana, a contagem de granulócitos imaturos possui algumas limitações no que diz respeito à metodologia utilizada. Muitas tecnologias tem sido desenvolvidas para a detecção dos granulócitos imaturos, um exemplo é a citometria de fluxo, que mostra grande especificidade e sensibilidade. Este artigo tem como objetivo avaliar a importância da utilização da contagem de granulócitos imaturos como marcador de infecção bacteriana e da citometria de fluxo como método padrão na detecção dos mesmos.

Palavras-chave: Granulócitos imaturos. Desvio nuclear à esquerda. Contagem diferencial automatizada.

ABSTRACT:

The immature granulocyte count has given space in laboratorial routine in the bacterial infection diagnosis. This is due to the fact that it is more specific than the band count, currently used in the clinical practice. But, despite that is a powerful indicator of bacterial infection, the immature granulocyte count has some limitations related to the methodology used. Many technologies have been developed to immature granulocyte detection, one example is the flow cytometric, that show great specificity and sensibility. This article has as purpose to evaluate the importance of immature granulocyte count utility as bacterial infection marker and of the flow cytometric as standard method in immature granulocyte detection.

Keywords: Immature granulocytes. Left-shifted. Automated differential count.

1. INTRODUÇÃO

Granulócitos imaturos são células encontradas, geralmente, na medula óssea de pacientes normais, que podem estar presente no sangue periférico devido a alguma alteração fisiológica ou patológica do organismo. Promielócitos, mielócitos e metamielócitos podem ajudar na detecção prévia de infecções bacterianas agudas e promover uma rápida e eficiente antibioticoterapia, diminuindo assim a morbidade e mortalidade.

A identificação, tanto de granulócitos imaturos quanto de bastonetes, pelas técnicas manuais e algumas técnicas automatizadas, têm deixado a desejar no que se diz respeito a sensibilidade e especificidade. Isso é devido as várias limitações relacionadas tanto com a metodologia do aparelho utilizado quanto pela visualização das células na extensão sanguínea. Atualmente está se discutindo muito o valor clínico da contagem de bastonetes como diagnóstico de um processo infeccioso bacteriano agudo, que é amplamente utilizado na prática médica.

Tendo em vista que granulócitos imaturos (GI's) tendem a ser mais específicos que bastonetes no que diz respeito ao diagnóstico laboratorial de um processo infeccioso bacteriano agudo e à prevenção de uma sepse, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para a detecção destas células. Deste modo, a presença de granulócitos imaturos, no sangue periférico, é considerado um marcador mais eficaz do processo infeccioso bacteriano agudo.

1.1 GRANULÓCITOS IMATUROS E DESVIO NUCLEAR À ESQUERDA

Os neutrófilos são os leucócitos que predominam no sangue periférico e representam a defesa inata contra os microorganismos. Os fatores de crescimento e as citocinas, produzidas pelos macrófagos teciduais e outras células, induzem o aumento da produção de neutrófilos pela medula óssea e fazem com que a medula lance essas células, precocemente, para o sangue periférico. Em situação fisiológica, os neutrófilos encontrados no sangue periférico estão na sua forma mais madura, a de segmentado. Mas, na vigência de um processo infeccioso agudo, os granulócitos imaturos podem ser vistos no sangue periférico, incluindo o aumento da contagem de bastonetes (CORNBLEET, 2002). Assim, o desvio à esquerda está tradicionalmente bem definido como a elevação da contagem de bastonetes, acompanhada ou não da presença de granulócitos imaturos (NIGRO, O'RIORDAN, MOLLOY, WALSH & SANDHAUS, 2005).

Os granulócitos imaturos (GI's) são precursores neutrofílicos produzidos na medula óssea a partir dos mieloblastos. Essas células estão divididas em estágios intermediários como promielócitos, mielócitos e metamielócitos, de acordo com o grau de maturação. Com exceção de neonatos e gestantes, apenas uma pequena porção

destas células é encontrada no sangue periférico de indivíduos normais (BAIN, 2007; FLEURY, 2003). O aumento dessas células pode ocorrer devido à uma infecção, principalmente bacteriana, ou uma doença inflamatória severa. Granulócitos imaturos também estão presentes em sangue periférico de usuários de alguns tipos de medicações, de pacientes com síndromes mielodisplásicas ou com doenças mieloproliferativas (FUJIMOTO, SAKATA, HAMAGUCHI, SHIGA, TOHYAMA, ICHIYAMA et al., 2000).

A presença de granulócitos imaturos, no sangue periférico, é uma informação importante porque mostra que a medula óssea está ativada e, também, pode fazer a distinção entre pacientes com neoplasias hematológicas dos pacientes com processo infeccioso bacteriano agudo (CENCI, MACONI & CASOLARI, 2005). A contagem de granulócitos imaturos, convencionalmente, é analisada a partir da extensão sanguínea e ao microscópio ótico. Entretanto, esta metodologia é imprecisa e há controvérsias quanto ao seu uso como indicador de infecção bacteriana (FUJIMOTO et al., 2000; NIGRO et al., 2005).

Atualmente, uma hemocultura positiva é considerada como diagnóstico de infecção bacteriana. A maior desvantagem das hemoculturas é o tempo de incubação que é relativamente longo. Algumas hemoculturas podem resultar falso-negativas por condições inapropriadas de cultura para organismos fastidiosos, quantidade insuficiente de sangue e a presença de antibióticos ou outros fatores inibidores presentes na amostra de sangue (ANSARI-LARI, KICKLER & BOROWITZ, 2003; CHAVES, TIERNO & XU, 2005).

Sendo assim, na busca de um parâmetro laboratorial mais específico no diagnóstico de um processo infeccioso bacteriano agudo e, consequentemente, na prevenção de uma sepse, muitos pesquisadores têm estudado a relação entre a presença de GI's, no sangue periférico, e a infecção bacteriana aguda. SENTHILNAYAGAM, KUMAR, SUKUMARAN e RAO (2012) avaliaram 200 pacientes febris quanto a presença de granulócitos imaturos, por automação, como preditor de infecção e constataram que a contagem relativa e absoluta foi estatisticamente significativa em pacientes com hemoculturas positivas.

ANSARI-LARI et al., (2003), estudaram a relação entre hemoculturas positivas e a quantidade de GI's encontrados no sangue periférico, por automação. Estes autores constataram que a porcentagem de GI's foi significativamente maior em pacientes com hemoculturas positivas do que nos pacientes com hemoculturas negativas. Também mostraram que a contagem de granulócitos imaturos **foi** o melhor parâmetro na prevenção da sepse do que a contagem total de leucócitos e a contagem de bastonetes. Porém, todos estes parâmetros têm baixa sensibilidade, o que quer dizer que apesar de auxiliarem muito no diagnóstico, não podem ser utilizados isoladamente.

Já NIGRO et al.,(2005), compararam a contagem manual de GI's com a automatizada e sua relação com a sepse em pacientes internados em uma unidade intensiva neonatal e com idade superior a sete dias. O estudo demonstrou que tanto a contagem manual quanto a automatizada tem baixa sensibilidade (35%) para o diagnóstico do processo infeccioso bacteriano agudo apesar da especificidade ser alta (88%). Mesmo pela baixa sensibilidade, de ambos os métodos, há uma associação significativa entre a elevação da contagem de GI's e os resultados de hemoculturas positivas. Há uma chance três vezes maior de se obter uma hemocultura positiva se houver a presença de GI's na contagem manual ou automatizada.

CHAVES et al., (2005), mostraram que há uma forte correlação entre o aumento de GI's e hemoculturas positivas. Além disso, observaram que a sensibilidade foi maior quando comparada com outros parâmetros laboratoriais, tais como: contagem global de leucócitos e número de neutrófilos. Sendo assim, os granulócitos imaturos têm se mostrado um bom parâmetro para o diagnóstico de infecção bacteriana aguda e prevenção da septicemia.

O aumento na contagem de bastonetes é amplamente utilizada na prática clínica como evidência de processo infeccioso bacteriano agudo, e de acordo com ela, os médicos podem mudar sua conduta clínica avaliando a resposta do paciente à terapia. Surpreendentemente, a utilização da contagem de bastonetes para o diagnóstico do processo infeccioso bacteriano agudo não é recomendada pelos livros de medicina interna, hematologia e medicina laboratorial, apesar da neutrofilia e do desvio nuclear à esquerda acompanharem os processos infecciosos ou inflamatórios agudos. A contagem de bastonetes possui diversas limitações e não é específica do processo infeccioso bacteriano agudo. Há uma variação de estímulos que podem levar ao aumento dessas células, incluindo processos inflamatórios, dano tissular ou necrose, convulsões, hemorragia ou hemólise. O diagnóstico de infecção em pacientes hospitalizados é difícil, pois o aumento da contagem de bastonetes também pode estar associada a algumas medicações (CORNBLEET, 2002).

Alguns estudos têm questionado a utilidade da contagem de bastonetes para o diagnóstico de infecção bacteriana aguda. ARDRON, WESTENGARD e DUTCHER (1994), estudaram a utilidade da contagem relativa de bastonetes em adultos com infecção bacteriana e contagem normal de leucócitos. A contagem de bastonetes não separou os pacientes infectados do grupo controle (pessoas sem infecção bacteriana). A presença de granulócitos imaturos e a contagem absoluta de neutrófilos foram os valores que melhor separaram os dois grupos. WASSERMANN, LEVISTEIN, KELLER, LEE e YOSHIKAWA (1989), fizeram a contagem de bastonetes em pacientes idosos com septicemia. O aumento da contagem de bastonetes mostrou alta especificidade, mas com sensibilidade muito baixa. A contagem elevada de bastonetes não pode ser utilizada como um marcador independente do processo infeccioso agudo e não pode

ser usado como um único parâmetro na prevenção da sepse em adultos (CORNBLEET, 2002).

A contagem de bastonetes tem uma baixa sensibilidade porque é realizada ao microscópio ótico e a partir de uma extensão sanguínea. O primeiro problema com a contagem de bastonetes é o número de células contadas, são contados 100 leucócitos. Esta quantidade de leucócitos é muito baixa para representar a quantidade de bastões e de granulócitos imaturos presentes na amostra sanguínea (CORNBLEET, 2002; BUTTARELLO & PLEBANI, 2008; CHAVES et al., 2005; WILE, HOMER, GAEHLER PHILLIPS & MILLAN, 2001). Outra dificuldade encontrada é a obtenção do valor de referência para a contagem de bastonetes devido a grande variabilidade que existe de acordo com a etnia e a idade do paciente. Leucócitos, neutrófilos e bastonetes são significativamente baixos em africanos e americanos e mais elevados em latino-americanos. A contagem de bastonetes é alta no período neonatal, diminuindo rapidamente nas primeiras duas semanas após o nascimento. Posteriormente, a contagem diminui lentamente para os níveis de um adulto, aproximadamente em torno dos cinco anos de idade (CORNBLEET, 2002).

A principal dificuldade na contagem de bastonetes é a grande variabilidade que existe interoperador na diferenciação entre segmentado e bastonete. Em 1993, o Colégio Americano de Patologistas (CAP) realizou uma pesquisa para avaliar a capacidade dos participantes em diferenciar morfológicamente bastonetes de segmentados. Aproximadamente 7500 laboratórios participaram da pesquisa e foram recomendados a primeiro utilizar seus próprios critérios de identificação e depois utilizar os critérios definidos pelo CAP. De acordo com o CAP, é considerado segmentado a célula que tiver um núcleo com separação completa de lóbulos, com um filamento visível e sem cromatina. Qualquer neutrófilo sem qualquer uma dessas características é considerado bastonete. Segundo o CAP, a contagem de bastonetes nas extensões sanguíneas enviadas aos laboratórios era de 50%. Foi verificado que quando os laboratórios utilizaram os seus próprios critérios de diferenciação a quantidade de bastonetes encontrada foi de 30,6%, a média variou de 11% a 50%. Quando os laboratórios utilizaram os critérios de diferenciação definidos pelo CAP a contagem foi de 41,7%, a média variou de 25% a 55,6%. Mesmo quando um laboratório utiliza um critério bem definido (critério CAP), há uma grande variabilidade nos resultados, o que dificulta a definição de valores de referência para bastonetes como parâmetro laboratorial. (CORNBLEET, 2002; NIGRO et al., 2005; CHAVES et al., 2005; WILE et al., 2001). Além disso, a técnica manual é cansativa, tem um alto custo e consome muito tempo na rotina laboratorial (WILE et al., 2001).

A contagem de granulócitos imaturos é um parâmetro melhor, que a contagem de bastonetes, como indicador de um processo infeccioso bacteriano agudo. A contagem manual de GI's não é recomendada devido ao baixo número de células

contadas. A melhor maneira de se evidenciar a presença de GI's, em uma amostra sanguínea, é pela contagem automatizada que deve ter precisão, especificidade e sensibilidade.

1.2 TECNOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE GRANULÓCITOS IMATUROS

Atualmente, os aparelhos automatizados têm grande precisão ao reportar a contagem diferencial de leucócitos em 5 partes ou mais. Mas a contagem de bastonetes e granulócitos imaturos não são reportados em todos os aparelhos. Alguns mostram alarmes ou avisos quando há um suposto aumento dessas células e nestas situações deve ser feita uma avaliação da extensão sanguínea ao microscópio ótico (CORNBLEET, 2002).

A grande diferença entre a contagem manual e automatizada está bem documentada na literatura e deve-se principalmente ao número de células contadas. Enquanto na contagem diferencial manual conta-se de 100 a 400 células, os aparelhos automatizados contam em torno de 8.000 a 10.000 células. Quando se leva em conta células que raramente são encontradas no sangue periférico (como é o caso dos GI's) o problema da contagem diferencial se intensifica, tornando a diferença entre os dois métodos muito maior. Para melhorar a quantificação de células imaturas têm se tentado desenvolver métodos de referência para a detecção de células jovens pela citometria de fluxo (FERNANDES & HAMAGUCHI, 2007; ROEHL, LANTZ, SYLVESTER & WANG, 2011).

A técnica da citometria de fluxo é baseada em um fluxo contínuo por onde as células são obrigadas a passar, recebendo estímulo de um laser semi-condutor em uma área de detecção. A amostra a ser analisada é previamente tratada com anticorpos monoclonais conjugados a um fluorocromo. Se o anticorpo monoclonal se ligar a um antígeno celular específico, quando a célula passar pela área de detecção será emitida uma fluorescência, o desvio da luz em vários ângulos fornece informações a respeito do tamanho da célula, quantidade de granulações, lobularidade e relação núcleo/citoplasma (FUJIMOTO et al., 2000; TSURUDA, TSUJI, USUI, KITAJIMA, KIHARA, MURAI et al., 1999).

TERSTAPPEN et al., (1990), usaram a técnica de citometria de fluxo para demonstrar a diferença de expressão de antígenos durante a maturação neutrofílica. Com isso, descobriram que o antígeno CD16 é expresso somente em neutrófilos maduros, ao passo que CD11b é expresso em alguns granulócitos imaturos, mas não em todos os estágios de maturação. Sendo assim, é possível detectar, com alta sensibilidade e especificidade, uma determinada célula. FUJIMOTO et al., (2000), demonstrou uma grande correlação entre o método da citometria de fluxo e o método manual, utilizando os anticorpos anti-CD16, anti-CD11b e anti-CD45.

LUND-JOHANSEN e TERSTAPPEN (1993) mostraram, através da citometria de fluxo, diferentes expressões de antígenos para moléculas responsáveis por adesões celulares durante a maturação granulocítica. Sugerindo, assim, que a maturação neutrófílica está associada à mudanças contínuas das propriedades das moléculas de adesão celular.

FERNANDES e HAMAGUCHI (2007) consideraram a citometria de fluxo como método de referência para a contagem de GI's utilizando o contador eletrônico Sysmex XE-2100, o qual possui a tecnologia de citometria de fluxo.

ANSARI-LARI et al., (2003), também compararam a performance do aparelho Sysmex XE-2100 com a contagem manual, a contagem de granulócitos imaturos mostrou sensibilidade, especificidade e eficácia de 92%, 81% e 83%, respectivamente. O mesmo aparelho é mencionado nos estudos de BUTARELLO e PLEBANI (2008), no que diz respeito à superioridade do método em relação ao método manual e à outros contadores eletrônicos.

CENCI et al., (2005), compararam o contador automático Sysmex XT-2000i, o qual também possui a tecnologia de citometria de fluxo, com o aparelho XE-2100, mostrando grande especificidade e sensibilidade na detecção de baixas, médias e altas concentrações de células mieloides imaturas. Também com grande concordância com o método manual.

RUZICKA, VEITL, THALHAMMER-SCHERRER e SCHWARZINGER (2001), usaram aparelho XE-2100 e confrontaram com o aparelho Sysmex NE-8000, o qual fornece informações sobre tamanho e densidade da célula através de radiofrequência. Também compararam os aparelhos com o método manual. E mais uma vez, o aparelho com a tecnologia de citometria de fluxo mostrou-se superior na detecção de granulócitos imaturos.

A citometria de fluxo deve ser usada como método padrão ouro na contagem de granulócito imaturos devido à sua alta sensibilidade e especificidade. E, também, por não haver interferência de neutrófilos maduros e nem depender da habilidade dos microscopistas para a detecção da presença de precursores mieloides.

2. CONCLUSÃO

Para o diagnóstico laboratorial de um processo infeccioso bacteriano agudo e a prevenção da sepse, a detecção de granulócitos imaturos, na contagem diferencial, tem se mostrado mais específica que a contagem de bastonetes e que a contagem global de leucócitos, mesmo quando se apresenta de forma isolada. O aumento da contagem de bastonetes, de forma isolada, não é significativo de infecção bacteriana. A vantagem da automação, em aparelhos que realizam a contagem de granulócitos imaturos, é o número de células contadas. Dependendo da quantidade de granulócitos

imaturos, presentes na amostra sanguínea, a contagem diferencial pela metodologia manual não consegue detectá-los. Sempre que o aparelho emitir alarmes de leucocitose ou leucopenia, de neutrofilia ou neutropenia e de presença de granulócitos imaturos acompanhado ou não do aumento da contagem de bastonetes a extensão sanguínea deve ser revisada ao microscópio ótico. Nesta revisão deve-se procurar pelas alterações leucocitárias como granulações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacuolização citoplasmática.

A presença de granulócitos imaturos não é esperada em situações fisiológicas, por isto tem um valor diagnóstico maior que a contagem de bastonetes na suspeita de um processo infeccioso bacteriano agudo.

3. REFERÊNCIAS

ARDRON, M. J., WESTENGARD, J. C. & DUTCHER, T. F. (1994). Band neutrophil counts are unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal total leukocyte counts. *American Journal Clinical Pathology*, Loma Linda, 102: 646-649.

ANSARI-LARI, M. A., KICKLER, T. S. & BOROWITZ, M. J. (2003). Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. *American Journal Clinical Pathology*, Baltimore, 120: 795-799.

BAIN, B. J. (2007). *Células sanguíneas: Um guia prático* (4a ed.). Porto Alegre: Artmed.

BUTTARELLO, M. & PLEBANI, M. (2008). Automated blood cell counts: State of the art. *American Journal Clinical Pathology*, Padova, 130: 104-116.

CORNBLEET, P. J. (2002). Clinical utility of the band count. *Clinics in Laboratory Medicine*, Stanford, 1: 101-136.

CENCI, A. M., MACONI, M. & CASOLARI, B. (2005). Evaluation of the diagnostic performance of the Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer in the detection of immature granulocytes. *Sysmex Journal International*, Modena, 15: 1-6.

CHAVES, F., TIERNO B. & XU, D. (2005). Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the coulter automated hematology analyzer. American Journal Clinical Pathology, Boston, 124: 440-444.

FAILACE, R. (2003). Hemogram: manual de interpretação (4a ed.). Porto Alegre: Artmed.

FUJIMOTO, H., SAKATA, T., HAMAGUCHI, Y., SHIGA, S., TOHYAMA, K., ICHIYAMA, S. et al. (2000). Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. Journal of the International Society for Advancement of Cytometry, Kobe, 42: 371-378.

FERNANDES, B. & HAMAGUCHI, Y. (2007). Automated enumeration of immature granulocytes. American Journal Clinical Pathology, Toronto, 128: 454-463.

LUND-JOHANSEN, F. & TERSTAPPEN, L. W. M.M. (1993). Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. Journal of Leukocyte Biology, Bergen, 54: 47-55.

NIGRO, K. G., O'RIORDAN, M., MOLLOY, E. J., WALSH, M. C. & SANDHAUS, L. M. (2005). Performance of an automated immature granulocyte count as predictor of neonatal sepsis. American Journal Clinical Pathology, Cleveland, 123: 618-624.

RUZICKA, K., VEITL, M., THALHAMMER-SCHERRER, R. & SCHWARZINGER, I. (2001). The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: Performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, Viena, 125: 391-396.

ROEHRL, M. H. A., LANTZ, D., SYLVESTER, C. & WANG, J. Y. (2011). Age-dependent reference ranges for automated assessment of immature granulocytes and clinical significance in an outpatient setting. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, Boston, 135: 471-477.

SENTHILNAYAGAM, B., KUMAR, T., SUKUMARAN, J. M. J. & RAO K, R. (2012). Automated measurement of immature granulocytes: Performance characteristics and utility in routine clinical practice. Pathology Research International, Padur.

TERSTAPPEN, L. W. M. M., SAFFORD, M. & LOKEN, M. R. (1990). Flow cytometric analysis of human bone marrow: III. Neutrophil maturation. Leukemia, San Jose, 4: 657-

663.

TSURUDA, K., TSUJI, T., USUI, T., KITAJIMA, S., KIHARA, A., MURAI, M. et al. (1999). Evaluation and clinical usefulness of the automated hematology analyzer, Sysmex XE-2100. *Sysmex Journal International*, Nagasaki, 9: 129-138.

WASSERMANN, M., LEVINSTEIN, M., KELLER, E., LEE, S. & YOSHIKAWA, T. T. (1989). Utility of fever, white blood cells, and differential count in predicting bacterial infections in the elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*, Los Angeles, 37: 537-543.

WILE, M. J., HOMER, L. D., GAEHLER, S., PHILLIPS, S. & MILLAN, J. (2001). Manual differential cell counts help predict bacterial infection. *American Journal Clinical Pathology*, Portland, 115: 644-649.