

Estallido respiratorio de neutrófilos por las técnicas del nitroazul tetrazolio (NBT) y dihidrorodamina (DHR) en niños con sospecha clínica de enfermedad granulomatosa crónica (EGC)

Neutrophil's respiratory burst by nitroblue tetrazolium (NBT) and dihydrorhodamine (DHR) techniques in children with clinical suspicion of chronic granulomatous disease (CGD)

Diana Sanabria¹, Vivian Giménez¹, María Mercedes Carpinelli¹, Celia Martínez de Cuellar²

RESUMEN

Introducción: El estallido respiratorio (ER) de neutrófilos es fundamental para la defensa contra infecciones, proceso ausente o ineficaz en la EGC, una inmunodeficiencia primaria (IDP) diagnosticada mediante la prueba del NBT. Actualmente se destacan las técnicas por citometría de flujo como la DHR, realizada únicamente en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), habiendo sido aplicada sólo en niños sanos. **Objetivo:** Evaluar el ER de neutrófilos por las técnicas NBT y DHR en niños con sospecha clínica de EGC y describir sus características clínico-demográficas. **Materiales y Métodos:** Se incluyeron 36 niños de ambos sexos, menores de 17 años de edad, remitidos al IICS entre el 2014-2015 por médicos especialistas. Se extrajo sangre para evaluación del ER de neutrófilos y se aplicó un cuestionario. **Resultados:** La mediana de edad fue de 4 años, 56% varones. Predominaron los pacientes hospitalizados, la sepsis y forunculosis cutánea fueron las manifestaciones clínicas más frecuentes y un 72% presentó recurrencia de infecciones con mediana de 3 episodios/año. El promedio para el IE de neutrófilos fue de 38,1±13,7 en el ensayo DHR, y 87±17% de activación para la prueba del NBT. En 8 pacientes los valores fueron

ABSTRACT

Introduction: The neutrophil's respiratory burst (RB) is essential for the defense against infections, this process is absent or ineffective in the CGD, a primary immunodeficiency (PID) diagnosed by the NBT test. Techniques that used flow cytometry such as DHR, performed only at the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), currently stand out, having been applied only to healthy children. **Objective:** To evaluate the neutrophil's RB using the NBT and DHR techniques in children with clinical suspicion of CGD and to describe their clinical and demographic characteristics. **Materials and methods:** 36 children of both sexes, with less than 17 years of age, that were referred to the IICS by specialists physicians between the years 2014-2015 were included. A blood sample was obtained to evaluate the neutrophil's RB and a questionnaire was applied. **Results:** The median age was of 4 years and 56 % were males. Predominantly the patients were hospitalized, being sepsis and cutaneous furunculosis the most frequent clinical manifestations and a 72 % presented recurrent infection with a median of 3 episodes/year. The average for the neutrophil's stimulation index (EI) was 38,1±13,7 with the DHR test, and 87±17% of activation for the NBT test. In

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

² Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. Instituto de Medicina Tropical, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Asunción, Paraguay.

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

Conflicto de intereses: Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

Recibido: 9/09/2016. Aceptado: 24/02/2017.

Doi: 10.18004/ped.2017.abril.49-55

inferiores al considerado normal y en un niño se confirmó EGC, observándose un patrón de herencia ligada al X. **Conclusión:** La evaluación del ER de neutrófilos permitió detectar un caso de EGC, determinándose el patrón hereditario mediante la técnica DHR por primera vez en el país. Es esencial el empleo de herramientas diagnósticas disponibles en niños con sospecha clínica de IDPs, para la detección y tratamiento oportunos que mejoran su calidad de vida y reducen la mortalidad.

Palabras clave: Estallido respiratorio, neutrófilos, NBT, DHR, citometría de flujo, EGC, herencia ligada al X.

INTRODUCCIÓN

La función fagocítica de los neutrófilos constituye un mecanismo fundamental de defensa contra infecciones en humanos. Los microorganismos fagocitados se destruyen mediante radicales libres de oxígeno formados por actividad catalítica del complejo enzimático NADPH oxidasa, proceso denominado estallido respiratorio (ER)^(1,2). Dicho complejo está constituido por seis subunidades proteicas, las mutaciones en genes que codifican para alguna subunidad ocasiona un ER ausente o ineficaz, característico de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), una inmunodeficiencia primaria (IDP) que cursa con infecciones recurrentes, severas e incluso fatales para el niño afectado^(3,4).

La incidencia de esta IDP se estima en 1/250.000 recién nacidos vivos, presentando dos patrones de herencia: recesiva ligada al cromosoma X, la más frecuente con 65% a 70% de los casos^(5,6), y autosómica recesiva alrededor de 25% de los casos⁽⁷⁾. La primera tiene una progresión clínica más rápida, un pronóstico de vida muy bajo y es diagnosticada en promedio al año de vida; la segunda tiene una presentación clínica menos agresiva, se manifiesta en edades mayores y tiene un pronóstico más alentador⁽³⁻⁵⁾.

Para el diagnóstico de EGC se recurre a la medición del ER de neutrófilos, demostrando ausencia o disminución de actividad NADPH oxidasa mediante la determinación de radicales libres de oxígeno generados. La reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) es una prueba ampliamente utilizada para el efecto^(8,9), sin embargo, en los últimos años han trascendido las técnicas por citometría de flujo como la oxidación de la dihidrorodamina (DHR), siendo

8 patients the values obtained were below the ones considered as normal and in one child CGD was confirmed, in which an X-linked inheritance pattern was observed. **Conclusion:** The evaluation of the neutrophil's RB allowed the detection of one case of CGD, and the inheritance pattern was determined by the DHR test for the first time in our country. The use of available diagnostic tools in children with clinical suspicion of PID is essential for the appropriate detection and treatment that improve the quality of life and reduce mortality.

Keywords: respiratory burst, neutrophils, NBT, DHR, flow cytometry, CGD, X-linked inheritance.

ésta utilizada de forma rutinaria en otros países^(10,11) ya que presenta significativas ventajas como la elevada sensibilidad y especificidad, además permite la identificación del tipo de herencia realizando la prueba a las madres de los niños con EGC^(12,13). La detección del patrón hereditario es muy importante a fin de ofrecer asesoramiento genético a la familia, conocer el pronóstico de la enfermedad y orientar a las portadoras sobre manifestaciones clínicas que pueden aparecer a lo largo de su vida, así como su mayor riesgo de padecer enfermedades autoinmunes^(14,15).

En el Paraguay, el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) es el único centro donde se realiza la prueba del NBT y recientemente se estandarizó el ensayo DHR, dicho proceso incluyó la determinación de valores de referencia en niños sanos de nuestra población⁽¹⁶⁾. Previamente a este estudio, la DHR aún no había sido aplicada a pacientes con sospecha clínica de EGC y los escasos estudios en sujetos con dicha patología se limitan a reportes de los primeros casos diagnosticados hace más de una década, por lo que puede suponerse un subdiagnóstico y subregistro de los afectados. El objetivo de este estudio fue evaluar el estallido respiratorio de neutrófilos por las técnicas del NBT y DHR en niños con sospecha clínica de EGC, así como describir las características clínico-demográficas de la población estudiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional descriptivo de corte transversal. Se incluyeron niños con sospecha clínica de EGC, de ambos sexos, menores de 17 años de

edad, que acudieron al Departamento de Inmunología del IICS entre marzo de 2014 y julio de 2015. El muestreo fue no probabilístico de casos consecutivos, seleccionando a los participantes con la colaboración de médicos especialistas en el área (pediatría, infectología, inmunología, asma y alergia), quienes solicitaron las pruebas NBT y DHR remitiéndolos al IICS para el registro de datos demográficos y clínicos en un cuestionario, además se inspeccionó las historias clínicas cuando fue posible acceder a las mismas.

Obtención de muestras sanguíneas: se utilizó sangre venosa recolectada en tubos con EDTA, tanto en pacientes ambulatorios como hospitalizados. El procesamiento de las muestras se realizó en un periodo no mayor a las dos horas desde la extracción.

Técnica del NBT: siguiendo el protocolo descrito por Acosta y col⁽¹⁷⁾, se dispensaron 50 µL de sangre en dos tubos, al etiquetado no estimulado (NE) se agregó 50 µL de solución NBT 0.002 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suspendido en Buffer Fosfato Salino (PBS), y al etiquetado estimulado (E) se agregó 50 µL de solución NBT con Phorbol-miristato-acetato (PMA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) de concentración final 1.6 µM, ambos fueron incubados en baño a 37 °C. Dos extendidos de cada tubo fueron fijados en metanol y teñidos con colorante Giemsa. Se examinaron 100 neutrófilos por microscopía óptica (100X), considerando activados a los que presentaron un precipitado azul en su citoplasma. El rango considerado de referencia fue de 86 - 100%⁽¹⁶⁾.

Técnica de DHR: según el ensayo descrito por Acosta y col⁽¹⁷⁾, a 100 µL de sangre se agregaron 4 mL de buffer de lisis NH₄CL 0.83g% por 3 minutos, se centrifugó a 1400 rpm por 5 minutos. Se lavó el pellet con 3 mL de PBS y luego se resuspendieron las células en 1 mL de PBS. A dos tubos de citómetro identificados como E y NE con 340 µL de la suspensión celular se agregó 150 µL de solución DHR (Invitrogen, Oregon, USA) a una concentración final de 87 µM y se incubaron 5 minutos en baño a 37 °C para agregar luego 150 µL de solución PMA (3.54 µM) al tubo E y 150 µL de PBS al tubo NE, incubándolos por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente fueron analizados en el citómetro de flujo FacsCalibur de Beckton Dickinson (San José CA, USA) con el software CellQuest. Los

resultados fueron expresados mediante el índice de estimulación de neutrófilos (IE), cociente entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) del tubo E y la IMF del tubo NE. El intervalo considerado como referencia fue de 22,5 - 60,4⁽¹⁶⁾.

Asuntos éticos: previa información verbal y escrita al responsable de cada niño se procedió a la firma de un consentimiento informado. Se respetó la confidencialidad de los datos y los resultados de las pruebas fueron entregados en tiempo y forma. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CEI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción.

Análisis estadístico: los datos recolectados fueron asentados en una hoja de cálculos del programa informático Microsoft Excel versión 8.0 y analizados con el programa estadístico SPSS versión 11.5 para Windows. Para describir variables categóricas se utilizó frecuencias y porcentajes, para las cuantitativas se empleó medias, desviación estándar, medianas y rangos, según corresponda.

RESULTADOS

En un total de 36 niños evaluados se encontró una mediana de 4 años de edad con rango de 0-16. El 56% (20/36) fueron del sexo masculino y el 58% (21/36) refirieron como procedencia ciudades del interior del país.

Se observó un predominio de 64% (23/36) de pacientes hospitalizados con respecto a los ambulatorios. Los cuadros clínicos de sepsis (22%) y forunculosis cutánea (19%) fueron los motivos más frecuentes de solicitud de las pruebas NBT/DHR, y en cuanto a los antecedentes familiares de IDPs, el 19% (7/36) tenía un hermano y/o hermana con infecciones a repetición (**Tabla 1**).

Se evaluaron otros datos clínicos observándose que el 72% (26/36) de los pacientes presentaron recurrencia de los episodios de infecciones en al menos dos ocasiones (mediana de 3 episodios por año con rango de 1 - 10) y para la edad de inicio de dichos episodios se encontró una mediana de 2 años con rango de 0 - 15. En la **tabla 2** se observa que las manifestaciones clínicas más frecuentes en las recurrencias fueron las forunculosis cutáneas (28%), las infecciones

respiratorias (17%) y las forunculosis cutáneas con abscesos (17%). Por otra parte, el 86% (31/36) de los niños estudiados requirió hospitalización en al menos una ocasión de los procesos infecciosos (mediana de una internación al año con rango de 0 – 10), y el 11% (4/36) de los pacientes tenía diagnóstico previo confirmado de alguna patología como alergia a ácaros (2/4), esferocitosis hereditaria (1/4) y reflujo gastroesofágico (1/4).

Tabla 1. Características clínicas de niños con sospecha clínica de EGC. N=36.

Característica	Frecuencia	%
Motivo de solicitud prueba NBT/DHR		
Sepsis	8	22
Forunculosis cutánea (FC)	7	19
FC con absceso	4	11
Adenopatías	4	11
Abscesos múltiples	4	11
Infección respiratoria	4	11
Meningitis	3	8
Otros	2	6
Antecedente familiar de IDPs		
Hermano/a con IR	7	19
Madre alérgica	4	11
Madre con EA	3	8
Muerte de varones*	3	8
Ninguno	19	53

IR: infecciones a repetición; EA: enfermedad autoinmune; *en los primeros años de vida

Tabla 2. Manifestaciones clínicas más frecuentes en las recurrencias de los episodios de infecciones en niños con sospecha clínica de EGC. N=36.

Manifestación clínica	Frecuencia	%
Forunculosis cutánea (FC)	10	28
Infecciones respiratorias	6	17
FC con abscesos	6	17
Adenopatías	3	8
Meningitis	1	3
Único episodio	10	28

En la evaluación del ER de neutrófilos, para el IE por la técnica DHR se observó un promedio±desviación estándar de 38,1±13,7 con rango de 1,0–62,3 y para el porcentaje de neutrófilos activados en la técnica del NBT, 87±17 con rango de 2 – 98 %. En la *tabla 3* se presentan los valores de 8 pacientes con resultados por debajo del intervalo de referencia, en 5 de ellos (pacientes N° 1, 6, 11, 17, y 28) se observaron alteraciones mínimas con respecto al límite inferior del rango normal y sólo en una de las pruebas, sin embargo los pacientes N° 4 y 15 presentaron alteraciones más considerables de dichos valores en ambas pruebas, y al consultar las historias clínicas de estos niños se encontró leucocitosis superior a 20.000 /mm³ según hemograma al momento de este estudio. En el caso del paciente N°34 los resultados

indican una funcionalidad de neutrófilos casi nula, permitiendo confirmar el diagnóstico de EGC en este niño. El paciente tenía 1 año de edad, procedente de la ciudad de Caaguazú, con antecedentes de forunculosis cutánea abscesada en el cuello a los 2 meses de nacido, requiriendo hospitalización por 15 días. En su historia clínica se encontró la ocurrencia de un segundo episodio de abscesos cutáneos en región anal con internación hospitalaria. Al momento del estudio nuevamente presentaba abscesos a nivel del cuello y se encontraba hospitalizado para su tratamiento.

Tabla 3. Valores por debajo del intervalo considerado de referencia para las pruebas del NBT y DHR. N=8.

Paciente N°	% NBT (86 – 100)*	IE (22,5 – 60,4)*
1	93	20,1
4	74	17,6
6	94	21,6
11	82	44,3
15	53	14,4
17	77	39,2
28	79	46,3
34	2	1,0

*: intervalo de referencia, %: porcentaje, IE: índice de estimulación

El análisis por citometría de flujo mediante la técnica DHR proporcionó histogramas de fluorescencia que mostraron comportamientos específicos para cada caso (*Figura 1*). En el paciente N°05 se observó un pico de fluorescencia basal en el ensayo no estimulado con PMA (*Figura 1A*) y en el ensayo estimulado se evidenció un desplazamiento de dicho pico (*Figura 1B*), este patrón indica activación normal de neutrófilos con producción del ER. En el caso del niño con EGC descrito anteriormente (paciente N°34), el ensayo no estimulado revela un pico basal de fluorescencia al igual que el niño con activación normal (*Figura 1C*), sin embargo en el ensayo estimulado con PMA se evidenció la ausencia de desplazamiento del pico (*Figura 1D*).

Este comportamiento es característico de los casos de EGC donde los neutrófilos no se activan y por tanto no se produce el ER. Por otra parte, el análisis de la muestra de la madre del niño con EGC, mostró que tan sólo un 64% de neutrófilos estaban activados en la prueba del NBT, mientras que en la prueba DHR se observó el pico basal de fluorescencia emitida por neutrófilos no estimulados con PMA (*Figura 1E*) y el ensayo estimulado permitió notar

dos poblaciones, una con IE=1,0 que incluía a aproximadamente el 25% de los neutrófilos y la otra población con IE=29,2 que corresponde al 75% restante (Figura 1F).

La observación de estas dos poblaciones en el histograma de fluorescencia para el ensayo estimulado con PMA, indica que el patrón de herencia de la enfermedad es recesiva ligada al cromosoma X.

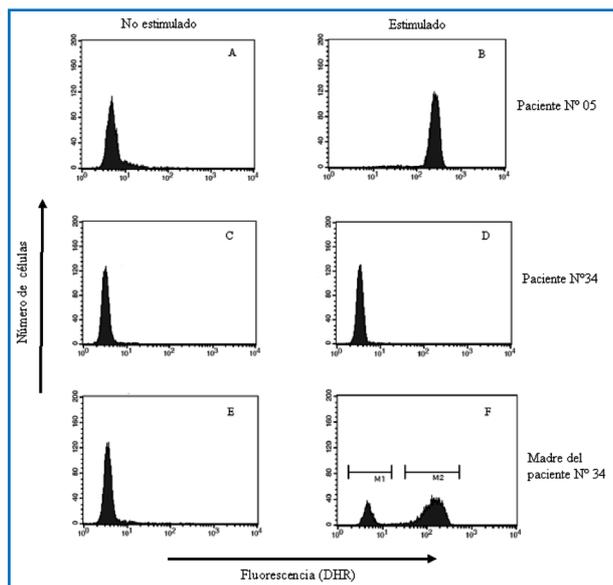


Figura 1. Histogramas de fluorescencia por citometría de flujo mediante la técnica DHR. Se observan los picos basales de fluorescencia para los ensayos no estimulados del paciente N°05 (A), el paciente N°34 con EGC (C) y la madre del paciente con EGC (E). En los ensayos estimulados se evidenció desplazamiento del pico en el paciente N°05 (B), ausencia de desplazamiento en el paciente con EGC (D) y dos poblaciones de neutrófilos en la madre del paciente con EGC (F). M1: población de neutrófilos no activados; M2: población de neutrófilos activados.

DISCUSIÓN

La capacidad de los neutrófilos para generar radicales libres de oxígeno en el ER, es parte esencial de los mecanismos de defensa contra infecciones en humanos. Esta producción es mediada por el complejo enzimático NADPH oxidasa y la importancia de su funcionalidad se demuestra clínicamente en los pacientes con EGC que padecen infecciones recurrentes, severas e incluso fatales⁽¹⁷⁾. Las técnicas del NBT y DHR contribuyen al diagnóstico ante un cuadro clínico sugestivo, la última permite incluso la detección del tipo de herencia de la enfermedad^(13,14).

Los niños que participaron de este estudio fueron mayoritariamente pacientes hospitalizados. Los cuadros clínicos que llevaron a las sospechas de EGC incluyeron sepsis y forunculosis cutánea con/sin abscesos como los más frecuentes, observándose también adenopatías, abscesos múltiples e infecciones respiratorias, y en aproximadamente la mitad de los evaluados se encontró algún antecedente familiar de IDPs. Estos hallazgos concuerdan con los datos clínicos sugestivos de EGC presentados por Ramírez-Vargas y col⁽¹³⁾, también coincide con lo mencionado por Álvarez-Cardona y col⁽³⁾ en pacientes con EGC: piel, hígado, ganglios, pulmón como sitios frecuentes de localización de infecciones severas y recurrentes; procesos infecciosos tipo sepsis, adenitis, abscesos; antecedentes familiares de consanguinidad y muerte de varones en el primer año de vida, entre otros.

Se reportó la recurrencia de episodios de infecciones en casi el 80% de los niños, con mediana de 3 episodios al año, y casi el 90% de los pacientes requirió hospitalización en al menos una ocasión. En este punto es importante destacar que a pesar de la repetición y severidad de las infecciones en la mayoría de los niños, las pruebas que evalúan el ER de neutrófilos resultaron con muy poca alteración en este estudio, observándose un promedio de $38,1 \pm 13,7$ para el IE por la técnica DHR y $87 \pm 17\%$ en la prueba del NBT, estos valores coinciden con lo reportado para niños sanos de nuestra población⁽¹⁶⁾. Al respecto pueden plantearse algunas explicaciones probables, por un lado debe considerarse que las IDPs son patologías muy poco frecuentes en la población general, con una incidencia que oscila entre 1:10000 a 1:200000 nacidos vivos, y en el conjunto de estas enfermedades, los defectos fagocíticos que incluye la alteración del ER de neutrófilos, constituyen solo el 18% de todas las inmunodeficiencias⁽¹⁸⁾. Por otro lado, durante los primeros dos años de vida el niño sufre una serie de infecciones que se han considerado "normales" ya que se presentan con frecuencia en la práctica clínica y se debe a una inmadurez fisiológica del sistema inmune, el cual está generalmente sometido a un ambiente adverso como la contaminación intra y extra domiciliaria, ingreso a guarderías en etapas tempranas, falta de lactancia materna, convivencia con portadores asintomáticos, estado nutricional deficiente, entre otros factores⁽¹⁹⁾. Por último, no debería descartarse

que los niños con pruebas de ER normales presenten una IDP diferente a la EGC, sobre todo aquellas que cursan con sintomatología semejante como neutropenia cíclica y deficiencia de adhesión leucocitaria, también los defectos en producción de anticuerpos y en funcionalidad de células T pueden presentar manifestaciones clínicas similares⁽²⁰⁾, por este motivo se recomienda la realización de estudios que evalúen los demás componentes del sistema inmunológico y que se encuentran disponibles en el país dentro del screening diagnóstico para IDPs, entre ellos, el recuento de subpoblaciones linfocitarias, dosaje de clases y subclases de inmunoglobulinas séricas, concentración de proteínas del complemento, entre otras determinaciones, la mayor parte de ellas son ofrecidas únicamente en el IICS.

Se registraron 8 pacientes con resultados por debajo del intervalo de referencia. En 5 de ellos las disminuciones fueron mínimas con respecto al límite inferior del intervalo, lo cual no se corresponde con los valores cercanos a cero característicos de la EGC^(3,5,11), por tanto, esta alteración del ER podría considerarse transitoria ya que se describen procesos patológicos con sintomatología semejante a dicha enfermedad, denominadas alteraciones clínicas de la función fagocítica: situaciones estresantes y/o traumáticas, terapia antibiótica prolongada, corticoides y otros inmunosupresores, politraumatismos y quemaduras⁽⁹⁾. Por otra parte, en 2 de los pacientes se encontró una disminución más considerable de los valores, los cuales tampoco fueron concluyentes de EGC ya que, como se mencionó anteriormente, en esta patología las pruebas del ER proporcionan resultados que indican actividad de neutrófilos casi nula con valores muy próximos a cero. De igual manera, conviene destacar estos dos casos ya que ambos niños presentaron leucocitosis superior a 20.000/mm³ según historia clínica y en la microscopía se observaron células granulocíticas jóvenes que no se activan de forma eficiente, por lo cual se sugiere que las pruebas para evaluar ER de neutrófilos sean solicitadas con recuentos leucocitarios cercanos al considerado normal.

En un solo paciente se observaron resultados de 2% en la prueba del NBT y 1,0 de IE por la técnica DHR, los cuales permitieron confirmar el diagnóstico de EGC en este niño, cabe resaltar nuevamente que ambas técnicas evalúan funcionalidad de neutrófilos y constituyen herramientas indispensables para diagnosticar la patología en sujetos con sospecha clínica^(8,12,15). El niño diagnosticado tenía 1 año de edad, su cuadro clínico fue de abscesos a nivel del cuello con antecedentes de forunculosis cutánea abscesada en la misma región y a nivel perianal. Estas características presentan bastante similitud con lo reportado por Soler-Palacín y col⁽¹²⁾, quienes observaron en 13 pacientes con EGC que la mitad de ellos fueron diagnosticados antes de los 3 años de edad y las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron abscesos y/o adenopatías abscesadas. Además de confirmar este caso se pudo determinar el tipo de herencia realizando la prueba DHR a la madre del niño con EGC, según el histograma de fluorescencia en la citometría de flujo se concluyó que el patrón de herencia es recesiva ligada al cromosoma X. Una de las importantes ventajas que presenta este ensayo con respecto al NBT, es detectar el patrón hereditario para conocer el pronóstico de la enfermedad y ofrecer asesoramiento genético a la familia^(13,14), el cual fue brindado a los padres del niño.

CONCLUSIÓN

La evaluación del ER de neutrófilos por las técnicas NBT y DHR permitió el diagnóstico de un caso de EGC en este estudio. Ambas técnicas proporcionaron en general valores concordantes, no obstante, mediante la prueba DHR se detectó el tipo de herencia en el niño afectado, siendo la primera vez en el país que se logra esta determinación.

Es esencial el empleo de las herramientas diagnósticas disponibles para el estudio de IDPs en niños con sospecha clínica, ya que el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno mejoran sustancialmente la calidad de vida y reducen la mortalidad asociada a estas patologías.

REFERENCIAS

1. Cascales M. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anal Real Acad Nac Farm.* 2005;71:365-386.
2. Cos Y, Torres I, Marsán V, Macías C. Defectos en la fagocitosis: aspectos clínicos, moleculares y terapéuticos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2004 Abr [citado 2014 Abr 12]; 20(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000100002&lng=es
3. Alvarez-Cardona A, Yamazaki-Nakashimada M, Espinosa-Padilla S. Chronic granulomatous disease. *Rev Alerg Mex.* 2009;56:165-174.
4. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;38:3-10.
5. Van den Berg JM, Van KE, Ahlin A. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One.* 2009;4:e5234.
6. Jaing TH, Lee WI, Cheng PJ, Chen SH, Huang JL, Soong YK. Successful unrelated donor cord blood transplantation for chronic granulomatous disease. *Int J Hematol.* 2010;91(4):670-72.
7. Roos D, Kuhns D, Maddalena A. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;44:291-299.
8. Vowells SJ, Fleisher TA, Sekhsaria S. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr.* 1996;128:104-107.
9. 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;2(2):26-30.
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. 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):83-9.
12. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta.* 2003;331:103-10.
13. 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):120-125.
14. 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, Asma e Inmunología Pediátricas.* 2013;22(3):96-100.
15. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kunhs DB. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrohodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:374-9.
16. Sanabria D, Giménez V, Carpinelli MM, Rolón J. 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. *Pediatr (Asunción).* 2016;43(1):33-38.
17. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease: report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore).* 2000;79:155-169.
18. O'Gorman MRG. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency. *Clin Lab Med.* 2007;27:591:626l.
19. Rodríguez Quiroz F. Evaluación del niño con infecciones recurrentes. *Honduras Pediátrica.* 2001;22(1):22-25.
20. Navarrete C. Infecciones en pacientes con inmunodeficiencia. *Rev Ped Elec.* 2005;2(3):36-39.