



Cátedra de Patología Médica A
Facultad de Medicina de Valencia

EL RECUENTO CELULAR EN ESPUTO COMO INDICE DE INFECCION BRONQUIAL ESTUDIO PRELIMINAR

J. Marín Pardo, S. Ruso Pacheco, R. Cuevas Verdú y
M. González Martínez

Introducción

La supresión de las causas predisponentes, es en nuestro criterio, uno de los pilares fundamentales en la lucha contra la bronquitis crónica. Siendo la polución^{1,4}, el medio de vida⁵, el tabaco^{1,6-13}, y las infecciones de las vías respiratorias¹³⁻³, frente a los que hay que plantearla más enérgicamente.

Al considerar el tratamiento de la infección bronquial en los enfermos con bronquitis crónica, y siendo conscientes de la importancia de la correcta valoración de la terapéutica antibiótica a largo plazo y del problema que un criterio de administración inadecuado puede crear, es necesario disponer de un método sencillo y práctico, que nos indique en qué momento la antibioterapia es necesaria, y fijar cuándo se puede suprimir, a fin de evitar:

- a) Causar resistencias y disbacteriosis
- b) Su elevado costo (*long term therapy*) y
- c) Dar lugar a reacciones alérgicas.

En consecuencia, la evidencia de infección bronquial y la identificación del germen causante, condicionan y crean la necesidad del tratamiento antibiótico adecuado.

Vergez, en un extenso estudio de la flora bacteriana, aislada del esputo concluye que los gérmenes que se aislen en una cantidad mayor de 96×10^6 bacterias/ml. de esputo, son gérmenes patógenos con seguridad

mientras que aquellos cuya cantidad fuera menor de 48×10^6 /ml de esputo, corresponderían a gérmenes saprofitos o habituales, estableciendo un tercer grupo, entre ambas cifras, en el que los gérmenes podrían ser indistintamente patógenos o habituales¹².

Monroe, por otra parte afirma que, solamente son patógenos aquellos cuya concentración sea mayor de 10^7 gérmenes/ml de esputo previamente lavado con suero fisiológico¹³.

Para el aislamiento de los gérmenes, se han propuesto técnicas, que van desde la obtención del esputo por drenaje postural, con lavado del mismo con suero fisiológico, hasta técnicas como la broncoaspiración con broncoscopio con catéter tras intubación, y otras como la punción transtraqueal ó transtraqueal¹⁴⁻¹⁶, estas últimas no se han mostrado mucho más eficaces que la obtención del esputo por drenaje postural, previo enjuague con antisepticos de la cavidad orofaríngea, para el aislamiento de los gérmenes. De tal suerte que Schoutens, en 100 casos estudiados, en los que se realizaron punciones transtraqueales, aspiración con catéter, y drenaje postural, para la obtención del esputo, encuentra una coincidencia del 75 % en los gérmenes aislados, aconsejando que, los dos primeros métodos indudablemente muy agresivos, se reserven solamente en casos de extrema

urgencia, ó como trabajo experimental, para probar la eficacia de un antibiótico¹⁶.

Todos estos métodos, en cualquiera de los casos, son secundarios a la evidencia de infección bronquial; no pudiendo proponerse como adecuados para una campaña extensa en la que se quiera establecer que enfermos son susceptibles de tratamiento antibiótico, y cuando debe ser suspendido.

Rawlins, y Miller, describieron correlaciones entre el número de células en esputo, y grado de agudización en un momento determinado, de un bronquítico crónico¹⁷⁻¹⁸. El primero de ellos observa, que los bronquíticos crónicos con carácter estable, tienen un número de células en el esputo que se mantiene constante; tomando como índice de reagudización y de eficacia antibiótica el recuento celular en esputo.

Elmes y White, así como Miller, observaron que la purulencia macroscópica del esputo, depende tanto del número de células, como de las fibras de DNP, derivadas de la desintegración celular, y que solo en las reagudizaciones de los bronquíticos crónicos la mayor parte de la purulencia macroscópica del mismo, reflejaría fundamentalmente un aumento en el número de células^{17,18}.

En el Simposium Internacional sobre bronquitis crónica, en 1960, se acordó que la enfermedad que-

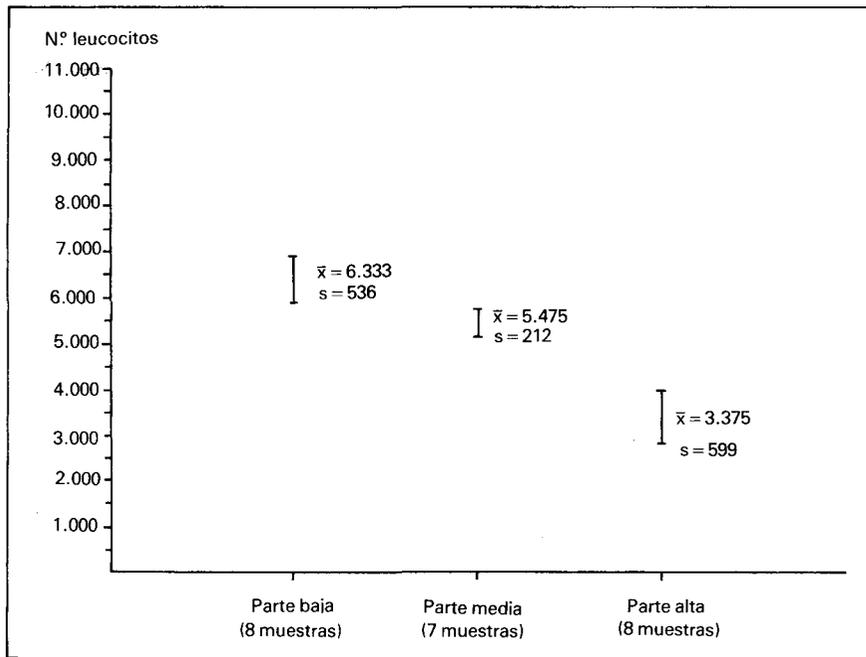


Fig. 1. Comprobación de la homogeneidad del esputo. Se tomaron tres muestras de un mismo esputo a distintos niveles del tubo de ensayo.

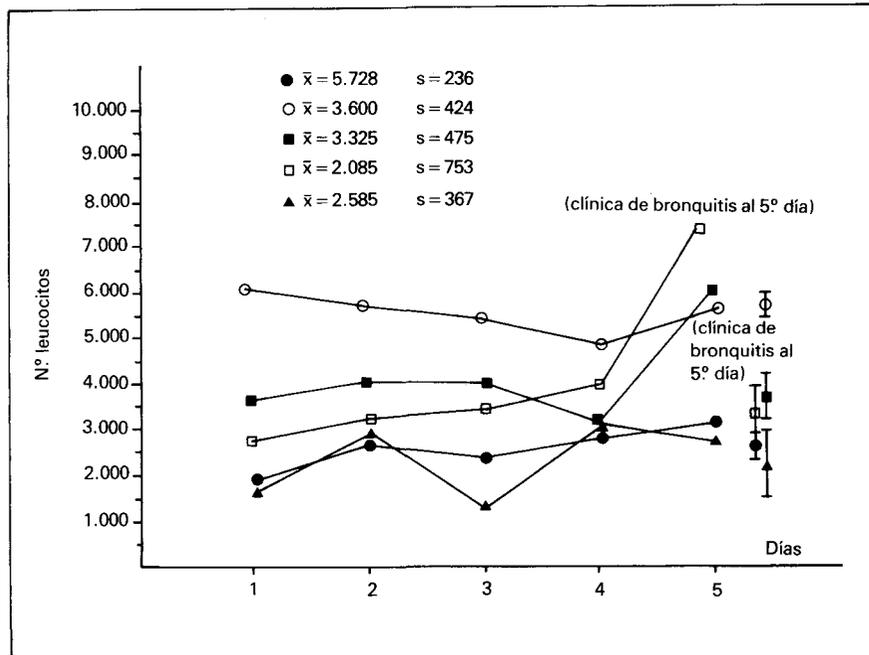


Fig. 2. Media y desviación estándar del número de leucocitos en el esputo en cinco casos de bronquitis crónica. Tres en situación de estabilidad y dos con reagudizaciones al 5.º día de observación.

daba definida en el laboratorio por: Infección, aumento del número de leucocitos y eosinófilos en el esputo y obstrucción generalizada de la vía aérea.

Define bronquitis eosinofílica, aquella que tiene más de un 60 % de eosinófilos en el recuento de leucocitos en el esputo, sin hallar bacterias

patógenas responsables; mientras que en la bronquitis crónica sólo el 5 % de los leucocitos serían eosinófilos. Miller y por otra parte Mulder, resaltaron que no encontraban una relación entre eosinofilia en esputo y bronquitis crónica, y que la eosinofilia en esputo no tiene relación con la hipersecreción bronquial que se pro-

duce en la bronquitis crónica; y añaden que, los casos en que hay hipersecreción con aumento de células en esputo, y eosinofilia, sin bacterias identificables serían a causa de una especial sensibilización del bronquio a irritantes físicos (humo, tabaco, polución...), o en otros casos a una predisposición atópica^{18,19}.

De todo ello se desprende que, el recuento de leucocitos en esputo, es un parámetro que cuantifica la respuesta defensiva del bronquio ante una agresión, que en caso de ser por una irritación física o en enfermedades atópicas, el aumento de células es paralelo al aumento porcentual de eosinófilos (60 % ó más), habiendo por otra parte, en caso de agresión bacteriana, un aumento de células sin aumento de eosinófilos.

Siendo el recuento de leucocitos en el esputo una técnica sencilla, poco costosa, y de gran rapidez, nos permite estudiar grandes poblaciones de bronquíticos crónicos, en los que el comienzo de una expectoración más abundante o de características macroscópicas de purulencia nos invitan en principio a iniciar el tratamiento antibiótico, y determinar objetivamente por el recuento celular en esputo, la forma adecuada de iniciar o suprimir la antibioterapia.

Material y método

Hemos seguido (con ligeras modificaciones que comentaremos), la técnica empleada por la Dra. Puchell en Nancy, de la cual recibimos la comunicación verbal, llevando para la realización de la técnica la siguiente metodología:

a) recogida, b) mantenimiento de la muestra c) homogeneización; d) tinción y e) recuento.

Los materiales requeridos en cada una de estas etapas están enumerados en la Tabla I. La recogida del esputo la llevamos a cabo mediante expectoración asistida.

La conservación del esputo ha de ser en

TABLA I

Materiales y fases del método

- 1) Recogida del esputo
Lecho inclinado con ángulo de 20° - 30°. Recipiente estéril o no para el esputo.
- 2) Conservación
Nevera con temperatura de 4° C.
- 3) Homogeneización
Agitador eléctrico energético.
Quimotrase inyectable de 50 mg.
Estufa a 37° C.
Tubo de ensayo graduado.
Jeringa de 5 ml.
- 4) Tinción
Solución de Randolph.
Pipeta de Potain.
- 5) Recuento leucocitario.
Cámara de Neubauer.
Microscopio Kremp Wetzlar con ocular de 15 x.
Objetivo de 10 x y objetivo de 44 x.

TABLA II

Solución de Randolph

Solución I: Azul de Metileno en Propilen-glicol al 0,1 %	50 ml.
Agua destilada	50 ml
Solución II: Floxina en Propilen-glicol al 0,1 %	50 ml.
Agua destilada	50 ml.
Ambas soluciones deben ser mezcladas en partes iguales. La solución definitiva tiene una duración de 4 h.	

TABLA III

Media y desviación estándar de tres esputos diferentes tomando cinco muestras de cada uno y observadas por cuatro técnicos distintos.

Observador	Espudo «A» (5 pipetas).	Espudo «B» (5 pipetas).	Espudo «C» (5 pipetas).
I	\bar{x} = 4280 s = 438	\bar{x} = 3080 s = 356	\bar{x} = 17140 s = 680
II	\bar{x} = 4300 s = 374	\bar{x} = 2920 s = 402	\bar{x} = 16860 s = 996,5
III	\bar{x} = 4500 s = 380	\bar{x} = 2780 s = 370	\bar{x} = 16780 s = 887
IV	\bar{x} = 4360 s = 207	\bar{x} = 2920 s = 460	\bar{x} = 17360 s = 477

una nevera a 4 °C, en caso de que la siguiente fase no se realice inmediatamente.

La homogeneización la realizamos por medio de la alfa-quimotripsina, modificando en este punto la técnica de E. Puchelle. Elegimos la alfa-quimotripsina, frente a otros cuatro proteolíticos ensayados, ya que realizó una destrucción más efectiva de la trama mucosa, respetando la integridad celular. La propiedad utilizada de proteolítico y esputo fue de 1/1, y para mayor exactitud utilizamos tubos graduados.

La mezcla es sometida entonces a agitación energética durante diez minutos, siendo incubada posteriormente a 37 °C hasta lograr la desaparición absoluta de toda la trama, requiriendo un tiempo de incubación que oscila entre 90 y 120 minutos.

Queremos resaltar la importancia de una buena homogeneización y correcta agitación de la mezcla. Nosotros encontramos que cuando la agitación no se realizó en todas direcciones (agitación manual en los tres planos del espacio), sino que fue realizada por agitadores mecánicos (que sólo pueden realizar la agitación en un plano del espacio) hubieron pequeñas diferencias según la muestra fuera tomada de la parte alta, media o baja del tubo (fig. 1). Hallando en un estudio que realizamos, con un esputo, del que se tomaron 7 muestras del tercio superior, 7 del tercio inferior, y 8 del medio (del tubo de ensayo al finalizar la homogeneización), que las tomadas del tercio medio del tubo, dieron un valor promedio, entre las tomadas del tercio superior y las del tercio inferior, y presentaron una desviación estándar muy pequeña, siendo por tanto las más homogéneas en la lectura.

Por lo que aconsejamos, bien hacer una agitación manual en todas direcciones, bien hacerla con un agitador mecánico, que realice la misma en los tres planos del espacio, comprobando siempre si se encuentran diferencias con la agitación manual, recomendando en caso de no conseguir una buena homogeneización que la muestra sea tomada del tercio central del tubo.

La tinción de la muestra, ya homogeneizada, la realizamos con la solución de Randolph, cuya composición se expresa en la tabla II. La duración de este colorante es de dos horas una vez se han mezclado sus componentes. Empleamos a continuación la pipeta de Potain,

realizando su carga como en un rutinario recuento de leucocitos en sangre periférica, manteniéndola en agitación energética durante diez minutos.

Transcurrido este tiempo despreciamos las 3-5 primeras gotas de la pipeta, y procedemos a la carga de la cámara de recuento.

El recuento de leucocitos lo realizamos en una cámara de Neubauer, utilizando los recuadros de un mm² que hay en los vértices y que se destinan a este menester. El microscopio empleado fue un Kremp-Wetzlar, con un ocular de 15x, y los objetivos de 10x, y 40x, sucesivamente; el primero de estos permite comprobar la dispersión homogénea de las células en la cámara, mientras que el segundo objetivo que abarca uno de los 16 sub-recuadros del mm², nos permite contar las células de este (no deben ser recontadas las células rotas).

Recontamos los cuatro recuadros de los vértices y hallamos el valor medio, este lo multiplicamos por 200 (multiplicamos por 100 para obtener el mm³, y por 2 porque el puto fue diluido al 1/1 con el proteolítico), obteniendo así el número de leucocitos por mm³ de esputo.

Comprobación del método

Hemos intentado demostrar la fiabilidad y reproducibilidad del método, para ello tomamos por una parte tres esputos diferentes que fueron leídos por cuatro técnicos distintos, cargando cada uno de ellos cinco pipetas de cada esputo, para estudiar las posibles diferencias debidas al error del observador (tabla III).

Por otra parte hicimos una serie de recuentos, en días sucesivos, en bronquíticos crónicos, en situación estable, para estudiar las posibles variaciones en un mismo enfermo, estando asintomático (fig. 2).

Resultados

En el estudio realizado por cuatro observadores distintos, tomando cinco muestras de tres esputos diferentes, comprobamos (tabla III), que las

variaciones individuales son mínimas de un observador a otro, y que la desviación estándar de las cinco muestras tomadas por cada observador, fue pequeña, descartando así errores importantes debidos al observador que realiza el recuento.

Los recuentos realizados en cinco enfermos bronquíticos crónicos en situación estable en días sucesivos, mostraron una gran homogeneidad en los valores obtenidos, exceptuando dos que en el 5.º día se presentaron clínica de infección bronquial, coincidente con un notable aumento del número de leucocitos (fig. 2).

Resumen

Queremos dar a conocer, la técnica que venimos utilizando desde hace dos años en nuestro servicio, para el control de las infecciones en los bronquíticos crónicos; teniendo la intención de en sucesivas publicaciones dar a conocer nuestra experiencia en estos dos años con la misma. Resultando que por su sencillez y exactitud (guarda una buena correlación con el número de bacterias/ml de esputo), es un método ideal para aquellos que controlan grandes poblaciones de bronquíticos crónicos, pudiendo acomodar en cada momento el tratamiento antibiotico del enfermo a su situación clínica.

Summary

CELLULAR RECOUNT IN SPUTUM AS AN INDEX OF BRONCHIAL INFECTION. PRELIMINARY STUDY

With this paper the authors want to make known the technique they have been using for the last two years in their service, for the control of infections in chronic bronchitics. Their intention is to make known their experience during these two years with this technique in successive papers. They emphasize the fact that its simplicity and exactitude (it maintains a good correlation with the of bacteriae/ml of sputum), make it an ideal method for whoever must control large populations of chronic bronchitics, thus being able to accomodate the antibiotic treatment of the patient with his clinical situation at all times.

AGRADECIMIENTO

Queremos hacer constar nuestro agradecimiento por la gran colaboración prestada para la realización técnica de este trabajo al ayudante tecnico sanitario D. Jaime Fernández Alvarez.



BIBLIOGRAFIA

1. FREOR, P.: Propositions pour un programme de lutte contre les bronchopaties chroniques. Dépistage et lutte contre les facteurs de risque. *Rev. Franç. Mal. Resp.*, 5: 7, 1977.
2. BOLINELLI, R.: Définition et histoire naturelle de la bronchite chronique. Les limites de nos connaissances. Intérêt de la démarche épidémiologique. *Rev. Franç. Mal. Resp.*: 5, 5-20, 1977.
3. SADOUL, P.: Pourquoi étudier l'épidémiologie des affections respiratoires chroniques. *Bull. Physio-Path. Resp.*, 11: 1, 1975.
4. SADOUL, P.: Problèmes médico-sociaux des bronchopaties chroniques graves. Fréquence. Perspectives de lutte. *Rev. Franç. Mal. Resp.*, 5: 115, 1977.
5. MASTRANGELO, G. y CLONFERO E.: Influence de la pollution sur la fonction respiratoire. Enquête chez les enfants de l'agglomération de Venise. *Bull. Europ. Physio-Path. Resp.* 12, 319-331, 1976.
6. CHICOU, F.J., LAFERRIERE, N., CANOLLE, G., LE TOURNEAU, E., BOULART, P. y TICHET, L.: Absentéisme et consommations médicamenteuses liés au tabaquisme et à la bronchite chronique dans une population de travailleurs. *Rev. Franç. Mal. Resp.*, 5: 135, 1977.
7. KLEISBAUER, J.P., POIRIER, R., FONDARAI, J., FELICIANO, J.M. y LAVAL, P.: Choix des paramètres fonctionnels respiratoires les plus discriminatoires dans une enquête épidémiologique sur la bronchite chronique. A propos d'une étude réalisée dans la construction navale. *Rev. Franç. Mal. Resp.*, 5: 107, 1977.
8. GAYRARD, P., OREHEK, J., GRIMAUD, CH. y CHARPIN, J.: Bronchoconstriction due à l'inhalation de fumée de tabac: Effets comparés chez le sujet normal et l'asthmatique. *Bull. Physio-Path. Resp.*, 10: 451, 1974.
9. PHAM, Q.T., MYRE, M., MARTIN, J., KNELSON, J. y GRAMPREY, J.: Prévalence de la bronchite chronique dans différents groupes socio-professionnels. II Ouvriers d'une usine sidérurgique. *Respiration*, 31: 418, 1974.
10. PHAM, Q.T., GIMENEZ, M., MYRE, M., CHASPOUL, H. y MARTIN, J.: Contribution à l'épidémiologie de la bronchite chez les travailleurs du bâtiment. *Bull. Physio-Path. Resp.*, 8: 769, 1972.
11. VOISIN, C., TONNEL, AB. y AERTS, C.: L'infection bactérienne dans la bronchite chronique. *Bull. Physio-Path. Resp.*, 9: 879, 1973.
12. VERGEZ, P. y RIOU, J.Y.: Etude de la flore bactérienne aérobie isolée des produits de l'expectoration dans les infections chroniques des bronches. *An. Inst. Pasteur*, 123: 201, 1972.
13. MONROE, P.W., MUCHMORE, H.G., FELTON, F.G. y PIRTLE, J.K.: Quantitation of microorganisms in sputum. *Appl. Microbiol.*, 18: 214, 1969.
14. MELETIER, J. y DUGUE, PH.: La flore bactérienne des affections broncho-pulmonaires courantes et les difficultés de son identification. *Press. Med.* 79: 1857, 1971.
15. PECORA, D.V.: Transtracheal aspiration in the diagnosis of acute lower respiratory tract infection. *New Engl. J. Med.*, 258: 71, 1958.
16. SCHOUTENS, E.: Study of bacterial flora obtained by tracheal puncture in infections pneumopathies. *Acta. Clin. Belg.*, 26: 78, 1971.
17. RAWLINS, G.A.: Cytological examination of sputum in relation to its macroscopic purulence. *J. Clin. Path.*, 8: 114, 1955.
18. MILLER, D.L.: A study of techniques for the examination of sputum in field survey of chronic bronchitis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 87: 473, 1963.
19. MULDER, J.: Bacteriology of bronchitis. *Proc. Roy Soc. Med.*, 49: 773, 1956.
20. PUCHELLE, E.: Comunicación verbal. Nancy 1974.