

El esputo inducido en el asma: estudio de validez y repetibilidad

J. Belda, J. Giner, P. Casan y J. Sanchis

Unidad de Función Pulmonar. Departamento de Neumología. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Barcelona.

El objetivo de este estudio ha sido determinar la validez y repetibilidad del proceso del recuento celular total y diferencial (RD) y de la determinación de proteína catiónica del eosinófilo (PCE) en el esputo inducido (EI).

Análisis clínico de la validez y fiabilidad de un instrumento de medida llevado a cabo en 21 asmáticos (edad: 31 [14] años, FEV₁: 78 [21]% val. referencia, PC₂₀FEV₁: 0,02 [1,1] mg/ml) y 10 sujetos sanos (30 [3] años, FEV₁: 99 [12]% val. referencia, PC₂₀FEV₁: >8 [3,7] mg/ml).

De cada individuo se obtuvo una muestra de esputo con suero salino hipertónico. Se separaron los tapones bronquiales de la saliva y se distribuyeron en dos porciones con la mínima contaminación de células escamosas posible. Ambas porciones fueron tratadas independiente y simultáneamente antes de 2 h, con una solución de dithiothreitol para dispersar las células y centrifugarlas. El sobrenadante se decantó y congeló a -70 °C para la posterior determinación de la PCE. El sedimento se tiñó con las tinciones de Papanicolaou, azul de toluidina y hematoxilina-eosina. El RD se expresó como porcentaje del total de células inflamatorias. La PCE se determinó con un CAP-System y el kit comercial (Pharmacia Diagnostics S.A., Uppsala, Suecia).

Dos sujetos de cada grupo fueron incapaces de producir una muestra adecuada de esputo (un 20% de los sanos y un 10% de los asmáticos). La validez del método se comprobó al obtenerse diferencias significativas entre asmáticos y sujetos sanos, tanto en el número de eosinófilos como en la PCE del EI. La repetibilidad del método se comprobó por la diferencia entre ambas porciones del EI, que no fue significativa para los diferentes tipos celulares, ni para la determinación de PCE. El coeficiente de correlación intraclase entre las porciones del EI osciló entre el 48 y el 77% para todos los tipos celulares, excepto para las células escamosas, que fue del 18%; para la PCE fue del 98%.

El RD y la determinación de PCE en el esputo inducido por suero salino hipertónico son válidos y repetibles.

Palabras clave: *Esputo inducido. Asma. Marcadores inflamación.*

Arch Bronconeumol 1997; 33: 325-330

Correspondencia: Dr. J. Sanchis Aldás.
Departamento de Neumología. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau.
Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona.

Recibido: 10-12-96; aceptado para su publicación: 4-2-97.

Proyecto financiado por Beca SEPAR 1995.

Induced sputum in asthma: a study of validity and reproducibility

To assess the validity and reproducibility of determining total and differential cell (DC) counts and of eosinophilic cationic protein (EPC) levels in induced sputum.

Clinical analysis of validity and reliability of a measurement tool.

Twenty-one asthmatics [age: 31(14) years; FEV₁: 78(21)% of reference value; PC₂₀FEV₁: 0.02(1.1)mg/ml] and 10 healthy subjects [age: 30(3) years, FEV₁: 99(12)% of reference value, PC₂₀FEV₁: >8(3.7)mg/ml].

A sputum sample was collected from each individual using hypertonic saline. Sputum was separated from saliva and then divided into two portions as uncontaminated as possible by squamous cells. Both portions were treated independently and simultaneously within two hours with a solution of bit-hiothreitol to disperse the cells, and then centrifuged. The supernatant was poured off and frozen at -70° for later determination of EPC. The sediment was stained with Papanicolaou stain, toluidine blue and eosin-hematoxylin. DC count was expressed as a percentage of total inflammatory cells. EPC was determined with a CAP-System and a commercial kit (Pharmacia Diagnostics SA, Uppsala, Sweden).

Two subjects in each group were unable to produce valid sputum samples (20% of healthy subjects and 10% of asthmatics). The validity of the method was demonstrated by significant differences between asthmatics and healthy subjects in both eosinophil and EPC levels. The reproducibility of method was verified by comparing the results for the sputum fractions; no significant differences were found in cell counts or EPC levels. The within-group correlation coefficients for the sputum fractions ranges between 48 and 77% for all cell types, except squamous cells, which gave a coefficient of 18%. For EPC the correlation coefficient was 98%.

DC and EPC determinations in sputum induced by hypertonic saline are valid and reproducible.

Key words: *Induced sputum. Asthma. Inflammatory markers.*

Introducción

El papel de la inflamación, tanto en la patogenia como en la evolución de la enfermedad asmática, es actualmente incuestionable¹. Numerosos trabajos han intentado "marcar" el tipo y el grado de inflamación exis-

tente en las vías aéreas del paciente asmático para poder así determinar el pronóstico y el tratamiento más adecuado en cada momento. Clásicamente, los marcadores son clínicos o funcionales y no siempre se relacionan con el grado de inflamación².

En años recientes se han introducido marcadores biológicos (como la proteína catiónica del eosinófilo [PCE]), determinados mediante técnicas de radioinmunoanálisis, que se correlacionan satisfactoriamente con la intensidad del cuadro clínico³. Sin embargo, estas determinaciones se realizan en sangre periférica, con la limitación que ello supone para representar lo que realmente ocurre en el pulmón. Al mismo tiempo y coincidiendo con el auge del sida, han aparecido técnicas no invasivas de recogida de secreción bronquial, que reflejan más correctamente los procesos locales pulmonares. El esputo, ya sea espontáneo o inducido, es un material potencialmente útil para estudiar los cambios celulares y metabólicos que la inflamación produce en la mucosa bronquial del paciente asmático⁴. Estudios previos han comprobado que el uso de muestras de esputo inducido (EI) de pacientes asmáticos es reproducible y útil para la investigación de la inflamación de la vía aérea en el asma⁵⁻⁸. Sin embargo, trabajos más recientes han puesto de manifiesto que pequeñas variaciones en la técnica, a falta de un estándar establecido, podrían producir notables diferencias en los resultados⁹⁻¹³.

Nuestro propósito fue comprobar la validez del recuento diferencial (RD) y de la determinación de PCE en el EI de sanos y asmáticos moderados, así como estudiar la repetibilidad del procedimiento de medición del RD y de la PCE.

Material y método

Pacientes

Se estudiaron 21 enfermos asmáticos que acudían a nuestro centro para estudio de su enfermedad y 10 individuos sanos, todos no fumadores. Los enfermos asmáticos cumplían los criterios de diagnóstico de asma descritos por la SEPAR¹⁴ y padecían asma moderada según la clasificación del Consenso Internacional¹⁵, bien controlada y en situación de estabilidad clínica en el último mes¹⁶ e historia de tratamiento con corticoides inhalados durante al menos un año. Los individuos sanos no tenían historia de clínica respiratoria, alérgica, o enfermedad alguna conocida. El protocolo del estudio fue aceptado por el comité de ética de nuestro centro y todos los individuos participaron voluntariamente en el estudio, habiendo sido cuidadosamente informados de sus características y propósito.

Método

A todos los participantes se les indujo el esputo con suero salino hipertónico, según el método descrito por Pin et al². Resumido brevemente, consiste en realizar una espirometría basal y administrar 200 µg de salbutamol; los valores posbroncodilatador se tomaban como referencia para el resto de la prueba. Tras un lavado *cuidadoso* de la nariz y boca con agua, se incitaba al paciente a recoger una muestra de esputo. Si el paciente era incapaz de expectorar una muestra adecuada se le hacía respirar un aerosol de una solución salina de NaCl hipertónico al 3% durante 10 min (Ultraneb 2000, DeVilbiss Health Care Inc. Somerset, PA, EE.UU.). La solución se generaba en

el momento de la prueba. Tras ello, se le pedía que volviese a enjuagarse bien la boca con agua y se le incitaba de nuevo a expectorar una muestra de esputo. Se realizaba una nueva espirometría y si se conseguía una muestra adecuada de esputo y el FEV₁ no descendía por debajo del 10%, se terminaba la prueba. Si la muestra no era adecuada se repetía este proceso con una concentración del 4%, o después con el 5%, hasta obtener una muestra adecuada de EI. La concentración de suero salino no se aumentaba cuando el FEV₁ caía más del 10% y se detenía el procedimiento si descendía más allá del 20%.

El esputo se recogía en un recipiente estéril de plástico (frascos con urinocultivo de 50 ml) y se transportaba al laboratorio para su proceso antes de 2 h. Para su descripción, la muestra se situaba sobre una placa de Petri pesada previamente, se pesaba el conjunto y se anotaba el color como *claro, blanco, gris, amarillo o verde*, clasificándose el aspecto en *mucoide o purulento* (entendiendo por *mucoide*: un material transparente, pegajoso y medio fluido, y por *purulento*: un material coloreado, denso y poco fluido). Las porciones más viscosas, consideradas esputo, eran reconocibles macroscópicamente sobre el frasco transparente y, por lo tanto, fácilmente identificables y seleccionables al depositar sobre la placa de Petri. Con un microscopio óptico se confirmaba que los tapones contenían material procedente de la vía aérea (tapones de células inflamatorias con o sin morfología tubular) seleccionándolos y apartándolos por medio de una pinza fina o una pipeta del resto de la muestra. Se marcaba la muestra como inútil cuando no se detectaban tapones bajo el microscopio óptico.

Los tapones extraídos cuidadosamente se situaban en un tubo de Eppendorf previamente pesado, hasta conseguir un peso de unos 20 a 150 mg, o bien cuando todos los tapones útiles se habían utilizado. Se registraba el peso del tubo con la muestra seleccionada. A la muestra de esputo se le añadían 1.000 µl de una solución reciente de dithiothreitol (DTT) (Sputalysin®, Boehringer Calbiochem Corp., San Diego, CA, EE.UU.). La solución de DTT se preparaba añadiendo una parte (ml) de Sputalysin® a 10 partes de agua destilada y removiendo durante 15 s con un agitador (Reax 2000, Heidolph, Alemania) para asegurar una adecuada mezcla. La mezcla del esputo y la solución de DTT se removía durante 30 s en el agitador, colocada sobre un banco mecedor (Reax 3, Heidolph, Alemania) durante 20 min y removida de nuevo durante 30 s.

La muestra así homogeneizada se filtraba en el mismo tubo de Eppendorf a través de un filtro de nailon de 2 × 2 cm² de 52 µm para eliminar los grumos celulares y desechos, montado sobre una jeringa de 10 ml (Discardit II, Beckton Dickinson, Fraga, España) y una aguja de 20 G (Microlance III, Beckton Dickinson, Fraga, España). El tubo de Eppendorf con la suspensión celular de la porción procesada del esputo se centrifugaba en una citocentrífuga (Hettich Universal 1200, Tuttlingen, Alemania) durante 10 min a 1.500 rpm. El sobrenadante se recogía cuidadosamente y se pasaba a otro tubo de Eppendorf, que se almacenaba a -70 °C hasta que la muestra se procesaba.

El sedimento celular restante se resuspendía con 20 µl de solución de trabajo de eosina (eosina diluida al 10%) y quedaba así preparado para el recuento por el método manual hemocitométrico en cámaras de Neubauer. El resultado se expresaba como el número total de células por unidad de peso de esputo procesado, permitiendo entonces la comparación entre muestras (número de células encontradas por unidad de peso de esputo = número absoluto de células encontradas en la porción procesada / peso del esputo procesado [10³ células/mg]). La solución de células restante se extendía sobre los portaobjetos y, tras unos minutos de secado con aire seco, se procedía a su fijación y almacenamiento con una dilución de formol al 10% quedando listos para su tinte. Las tinciones utilizadas fueron: la *tinción de Papanicolaou* para el recuento diferen-

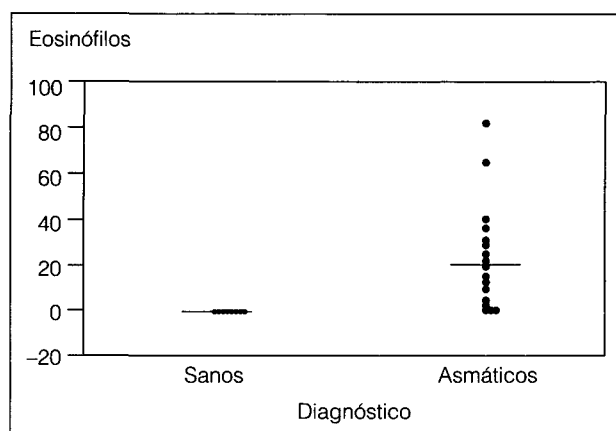


Fig. 1. Representación gráfica de las diferencias en el porcentaje de eosinófilos entre individuos sanos y asmáticos en esputo. La línea continua paralela al eje de abscisas indica el valor medio obtenido y las dos líneas discontinuas indican ± 2 errores típicos de la diferencia media, como muestra de la precisión de la medida.

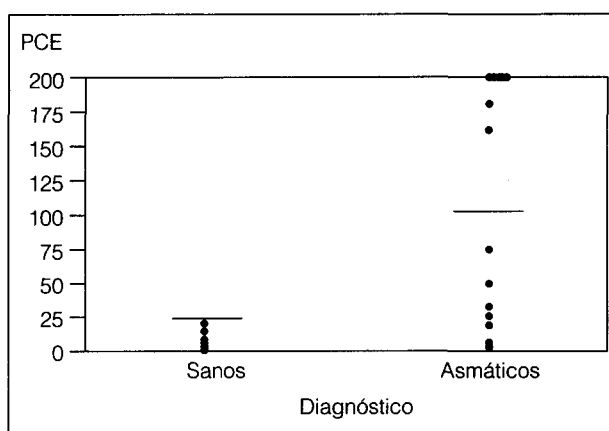


Fig. 2. Representación gráfica de las diferencias en el nivel de proteína catiónica del eosinófilo (PCE) determinado entre individuos sanos y asmáticos en esputo. La línea continua paralela al eje de abscisas indica el valor medio obtenido y las dos líneas discontinuas indican ± 2 errores típicos de la diferencia media, como muestra de la precisión de la medida.

cial general, la tinción con *hematoxilina-eosina* para el recuento específico de eosinófilos y la tinción de *azul de toluidina* para el recuento específico de células metacromáticas. Los portaobjetos teñidos fueron secados automáticamente y cubiertos con un filme de plástico (diatex) para la preservación celular.

Para el recuento celular se usó un microscopio óptico con el objetivo de 40x y la pieza ocular 10x. Se contaban más de 20 campos por portaobjetos o 400 células (1.500 células para el teñido metacromático) por portaobjetos. Las células se clasificaban como epiteliales de vías respiratorias altas (escamosas) (CE), bronquiales (CB), linfocitos (Li), macrófagos (Ma), monocitos (Mo), eosinófilos (Eo), neutrófilos (PMN) y células metacromáticas (MCC) (mastocitos o basófilos).

La validez de las *muestras* de esputo se valoró en dos aspectos: *a)* obtener una cantidad de tapones bronquiales suficientes para realizar el estudio, es decir, que su peso fuera superior a 20 mg (hasta unos 150 mg), y *b)* que el número de células epiteliales encontradas no fuera superior al 40% del total, controlando así el grado de contaminación salivar de la muestra.

La *validez del método*, al carecer de una regla de oro o método de referencia, se comprobó con la búsqueda de una posible diferencia significativa entre los resultados obtenidos en ambos grupos de individuos (asmáticos y sanos) *utilizando la U de Mann-Withney para datos independientes* y comprobando que los resultados eran similares a los descritos en estudios previos con este mismo método.

La *repetibilidad* del método se valoró al estudiar separadamente dos porciones de cada muestra, cuya diferencia entre éstas no debía ser significativa, según la prueba de la *t* de Student para datos apareados y el coeficiente de correlación intraclass para evaluar la concordancia entre resultados.

Resultados

Las características antropométricas de los 10 sujetos sanos y de los 21 asmáticos se resumen en la tabla I. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en la edad o sexo.

Dos individuos de cada grupo fueron incapaces de obtener una muestra válida de esputo, por lo que se descartaron del estudio (un 20% de total de sanos y un 10% de los asmáticos). La prueba fue muy bien tolerada,

con una respuesta media del FEV₁ que puede verse en la tabla II.

El estudio de la validez (tabla III) mostró una diferencia significativa entre sanos y asmáticos en el porcentaje de eosinófilos (fig. 1), neutrófilos, células escamosas y de la PCE (fig. 2). En los asmáticos había una

TABLA I
Características antropométricas, funcionales y clínicas de los individuos estudiados

| | Sanos | Asmáticos |
|---|-------------|-------------|
| Edad (años) | 30 (3) | 31 (14) |
| Sexo (V/M) | 4/6 | 7/14 |
| PEF previo (lpm) | 550 (80) | 410 (180) |
| FEV ₁ (l) | 3,25 (0,25) | 2,78 (0,80) |
| FEV ₁ (% val. referencia) | 97 (12) | 83 (21) |
| PC ₂₀ FEV ₁ (mg/ml) | 5,4 (3,7) | 0,02 (1,1) |
| Historia previa asma (años) | - | 13,9 (4,2) |
| Puntuación Aas (puntos) | - | 3,27 (0,5) |
| Budesonida inhalada (µg/día) | - | 788 (150) |

Valores medios (desviación típica). PEF: flujo máximo espiratorio; FEV₁: volumen espiratorio máximo en el primer segundo; PC₂₀FEV₁: concentración de metacolina necesaria para producir una disminución del 20% en el FEV₁; Aas: puntuación clínica descrita por Aas (Aas K. Heterogeneity of bronchial asthma. *Allergy* 1981; 36: 3-14).

TABLA II
Tolerancia y características del esputo inducido

| | Sanos | Asmáticos |
|--|------------------|------------------|
| Incapaces obtener esputo | 2 (20%) | 2 (10%) |
| FEV ₁ post (% val. inicial) | +4,3% (0-5%) | +9,2% (0-39%) |
| FEV ₁ posnebulización (%) | -0,3% (-2,1) | -0,2% (-7-12) |
| Concentración de suero salino (%) | 4,5% | 3,25% |
| Peso total del esputo (g) | 4,89 (2,96-6,83) | 3,92 (1,02-1,04) |
| Número tapones | 6,9 (4-20) | 14,3 (2-20) |
| Peso tapones seleccionados (mg) | 68 (30-240) | 143,5 (20-800) |

Valores medios y margen entre paréntesis. Abreviaturas como tabla I.

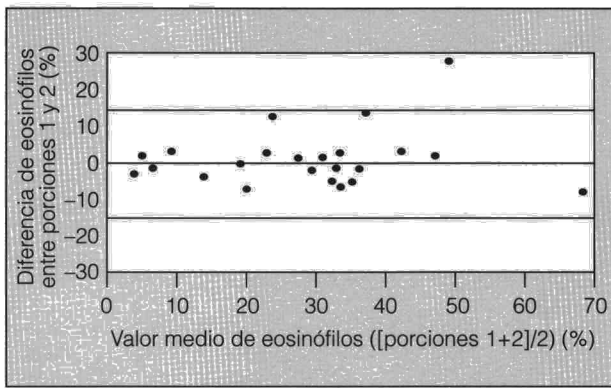


Fig. 3. Representación gráfica de las diferencias entre porciones en el recuento de eosinófilos en esputo. Las líneas paralelas al eje de abscisas indican ± 2 desviaciones típicas de la diferencia media. Sólo un punto supera estos límites aceptables.

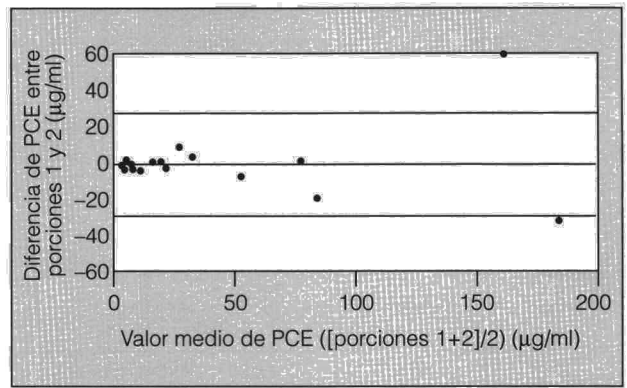


Fig. 4. Representación gráfica de las diferencias entre porciones en la determinación de la concentración de proteína catiónica del eosinófilo (PCE) en esputo. Las líneas paralelas al eje de abscisas indican ± 2 desviaciones típicas de la diferencia media. Sólo dos puntos superan estos límites aceptables.

tendencia a ser superiores el número total de células y el porcentaje de linfocitos, aunque no llegó a ser significativa probablemente por la gran dispersión interindividual en el grupo de asmáticos.

El estudio de la repetibilidad no encontró diferencias significativas entre los recuentos diferenciales de ningún tipo celular, ni de la PCE, con un coeficiente de correlación intraclase (Ri) que osciló entre el 48 y el 77% para las distintas células inflamatorias y del 18 y el 60% para las CE y CB, respectivamente. La PCE presentó un Ri del 96% (tabla IV). La representación gráfica de las diferencias entre ambas porciones en el estudio de la concordancia mostró dispersiones homogéneas e inferiores a los márgenes aceptables (2 DE) para todos los tipos celulares y para la PCE (figs. 3 y 4).

Discusión

El método utilizado aquí incluye la selección en fresco de tapones bronquiales de esputo con el objetivo de conseguir la mínima contaminación salivar, dispersar las células con el DTT y el filtrado mecánico, su centrifugado y decantado para el análisis celular y bioquímico posterior. Los resultados del estudio muestran que el análisis celular y bioquímico del EI son distintos en sanos y en asmáticos, presentando una repetibilidad buena. Por lo tanto, su aplicación al estudio y seguimiento de la inflamación en el asma es una alternativa a otros métodos más invasivos como la broncoscopia.

Aunque sólo hay un trabajo publicado¹⁷, múltiples comunicaciones¹⁸⁻²³ han dado soporte a la hipótesis de que el esputo inducido y el espontáneo, el lavado broncoalveolar (BAL), el broncoaspirado y la biopsia bronquial podrían dar resultados superponibles en el asma. Sin embargo, como el paciente asmático no suele presentar hipersecreción bronquial, sería difícil obtener un broncoaspirado directo como técnica de referencia, lo que obligaría a utilizar el aspirado del lavado bronquial que permitiese su obtención. También podríamos compararlo con la biopsia bronquial que reflejaría de la forma más exacta posible el estado inflamatorio de la vía aérea, pero los factores que determinan la descamación celular

pueden condicionar que el esputo refleje sólo las zonas más próximas de las vías respiratorias. Estas técnicas no están exentas de problemas como la importancia desconocida de la dilución o la dificultad de la cuantificación celular de las muestras histológicas. Por todo ello, se podría considerar una alternativa válida la comparación con los resultados obtenidos por otros grupos, ya que si coinciden se puede asumir que miden lo mismo. Nuestros resultados no difieren de forma importante de los de

TABLA III
Resultados de la citología de esputo. Comparación entre sanos y asmáticos

| | Sanos | Asmáticos | Diferencia (p) |
|-------------------------------------|-------------|-------------|----------------|
| Total células (10 ³ /mg) | 11,1 (9,9) | 27,4 (35,8) | 16,3 (NS) |
| Macrófagos (%) | 35,0 (24,4) | 34,5 (24,5) | 0,5 (NS) |
| Monocitos (%) | 0,0 (0,0) | 0,5 (2,1) | 0,5 (NS) |
| Neutrófilos | 11,2 (14,5) | 29,6 (21,5) | 18,4 (0,02) |
| Eosinófilos (%) | 0,0 (0,0) | 22,2 (22,4) | 22,2 (0,007) |
| Linfocitos (%) | 10,5 (10,1) | 12,8 (13,6) | 2,3 (NS) |
| Células bronquiales (5) | 2,1 (4,1) | 4,9 (8,9) | 2,7 (NS) |
| Células escamosas (5) | 35 (12) | 20 (13,8) | 14,9 (0,0001) |
| PCE esputo (ng/ml) | 12,6 (11,8) | 107 (91) | 94 (0,01) |

Valores medios (desviación típica). NS: no significativa; PCE: proteína catiónica del eosinófilo.

TABLA IV
Comparación entre ambas porciones de esputo seleccionado

| | Porción 1 | Porción 2 | Diferencia (p) | Ri (%) |
|----------------------------------|-------------|-------------|----------------|--------|
| Total cél. (10 ³ /mg) | 26,7 (37,1) | 27,3 (36,6) | 0,5 (NS) | 67 |
| Macrófagos (%) | 34,9 (25,5) | 36,0 (25,8) | 1,1 (NS) | 48 |
| Monocitos (%) | 0,4 (2,2) | 0,5 (2,5) | 0,1 (NS) | 77 |
| Neutrófilos (%) | 28,5 (23,4) | 30,5 (21,0) | 2,0 (NS) | 64 |
| Eosinófilos (%) | 22,2 (23,6) | 19,8 (22,0) | 2,5 (NS) | 70 |
| Linfocitos (%) | 13,9 (17,5) | 12,6 (12,4) | 1,3 (NS) | 48 |
| Células bronquiales (%) | 4,5 (9,4) | 5,4 (9,4) | 0,9 (NS) | 60 |
| Células escamosas (%) | 22,4 (16,6) | 18,2 (14,6) | 4,3 (NS) | 18 |
| PCE esputo (ng/ml) | 80,3 (87,6) | 76,3 (88,3) | 4 (NS) | 82 |

Valores medios (desviación típica). PCE: proteína catiónica del eosinófilo; NS: no significativa.

otros estudios publicados^{5,6,13,17-20,24-27}. No encontramos células metacromáticas descritas en otros trabajos, aunque son relativamente raras (0,05-4%). La razón no es conocida, pero podría estar relacionada con la situación de estabilidad estricta en la que se encontraban los pacientes y la homogeneidad en el tratamiento corticoide inhalado, que contrasta con la de otros autores.

Por otra parte, el análisis de la repetibilidad de una técnica abarca diferentes aspectos como la variabilidad de las medidas a lo largo del tiempo, variabilidad entre el intrasujeto, intramuestra y entre observadores. No está descrita la variabilidad del método en cuanto al efecto de las diferencias en la manipulación de la muestra ni de seleccionar diferentes tapones de esputo dentro de cada muestra del EI (variabilidad de la selección y manipulación de las muestras) sobre el resultado final^{5,6,13}. Los resultados aquí aportados confirman que se trata de una técnica consistente. *Es importante destacar que aunque hubo grandes diferencias en los pesos de los tapones entre las muestras obtenidas (20-800 mg) y esto determinaba la cantidad de células totales que encontramos, cuando se ajustaba por el peso, la cantidad de células obtenidas fue similar entre los individuos de cada grupo, independientemente del peso de los tapones seleccionados ($r = 0,18$). Por otra parte, y como puede apreciarse en la tabla II, los asmáticos obtenían mayor peso y cantidad de tapones seleccionados que los individuos sanos y, por lo tanto, una mayor cantidad de células totales; sin embargo, esta mayor cantidad de células tampoco se relacionaba con el recuento diferencial obtenido al ajustarlas por peso dentro del grupo de asmáticos ($r = 0,07$).*

El método utilizado en este trabajo es una adaptación y modificación del descrito por Gibson et al⁴ basándose en métodos previamente establecidos. Posteriormente Pin et al⁵ lo aplicaron al esputo inducido por una solución salina hipertónica inhalada. Esta técnica fue factible y segura, obteniéndose esputo útil en el 76% de los casos. La validez de los recuentos se demostró por las diferencias entre los sujetos con diferentes condiciones. Así, el recuento de eosinófilos y células metacromáticas fue mayor en el esputo de asmáticos que en el de adultos fumadores con bronquitis crónica simple o en el de sanos, y esta diferencia fue similar a la previamente descrita con el uso del fluido del BAL.

Existen otros métodos para obtener el EI. Fahy et al⁶ usan esputo inducido contaminado con saliva para medir las células, albúmina, fibrinógeno, PCE, histamina y triptasa en el sobrenadante. Dichos autores comprueban un aumento en los niveles de eosinófilos, albúmina, fibrinógeno y PCE en los asmáticos respecto a los sujetos sanos. Nuestros resultados también reflejan estas diferencias en el número de eosinófilos, pero la presencia de un mayor número de células escamosas en los sujetos sanos podría deberse a la mayor dificultad de obtener los tapones bronquiales en los sanos que, además, requerirían una mayor dosis nebulizada, observándose un mayor peso global pero un menor peso y número de tapones seleccionados. Virchow et al⁷ también encuentran niveles de PCE elevados en el esputo espontáneo de asmáticos. Fahy et al⁶ detectan niveles de 240 $\mu\text{g/ml}$

y Virchow et al⁷ de 170 $\mu\text{g/ml}$, aunque en ambos casos la técnica utilizada para obtener el EI no es igual a la utilizada en el presente estudio. El grupo de McMaster¹³ obtiene valores medios más elevados, de 286 $\mu\text{g/ml}$, con una técnica idéntica pero *su grupo de pacientes constituye* una muestra más heterogénea. En conjunto, todos estos resultados indican que el examen del EI es un método directo para investigar la inflamación de la vía aérea de forma no invasiva. Sin embargo, algunas cuestiones permanecen aún en discusión como:

— ¿Es necesaria la selección de los tapones de moco bronquial? Al seleccionar los tapones de moco, conseguiríamos evitar al máximo la contaminación con saliva e incluso secreciones nasales y esofágicas. El recuento celular tradicional de esputo consideraba que aquellas muestras con más de un 10% de CE en el recuento total estaban contaminadas, ya que su origen no era la vía aérea. En el EI la mayor parte de la muestra (más del 90%) sería saliva y el propio suero hipertónico nebulizado. Sin embargo, en los tapones bronquiales, el contenido celular es prácticamente inflamatorio o CB, por lo que una selección cuidadosa de los mismos permitiría estudiar solamente aquello que interesa. Por otra parte, el examen citológico de la secreción salivar de un paciente, sin procesos inflamatorios orofaríngeos, carece prácticamente de mediadores de la inflamación y de células inflamatorias, siendo prácticamente el 100% CE⁶. Esto permitiría suponer, si el paciente se limpia la boca y la secreción nasal posterior, que todas las células inflamatorias y mediadores encontrados en el EI procederían exclusivamente de la vía aérea. Por este motivo, algunos grupos argumentan que sería innecesario seleccionar los tapones y que bastaría con obviar las células contaminantes y valorar exclusivamente el componente inflamatorio. Por ello los resultados porcentuales se expresan sobre el total de células inflamatorias sin tener en cuenta las células epiteliales (escamosas y bronquiales). Trabajos posteriores^{13,24,28} han permitido comprobar que sería preferible, pese a todo, realizar la selección de los tapones, ya que la presencia de gran número de células contaminantes dificulta los recuentos y podría influir en los cálculos. Además, la cantidad de mediadores presente en los tapones parece ser diferente a la de la muestra total obtenida, como si el microambiente del tapón evitase la dilución manteniendo la concentración original o protegiese a ciertas moléculas de su catabolismo natural.

— ¿La manipulación producida por esta técnica no estaría modificando los resultados? Esta técnica es muy repetible, ya que diferentes aspectos como el método de nebulización, la concentración usada, la protección previa con distintos broncodilatadores o el uso del DDT no modifican el resultado.

— ¿Son superponibles los resultados obtenidos con esputo espontáneo? Podríamos aceptar que el EI con suero salino hipertónico sería una alternativa válida al esputo espontáneo (difícil de obtener en el asmático estable) ya que los resultados del análisis celular y bioquímico parecen ser superponibles^{4,7,23}.

– Finalmente, ¿no es difícil obtener muestras adecuadas en estos pacientes? Aunque puede ser difícil obtener muestras adecuadas en algunos pacientes (hasta el 20% de las inducciones de esputo practicadas), esto no supondría un gran problema ya que al ser una técnica segura (en ningún caso hubo que paralizar la técnica por haberse producido un descenso del FEV₁ superior al 20%), podría repetirse en diferentes ocasiones sin riesgo para el paciente. Algunos grupos llegan a sugerir que podría utilizarse incluso en exacerbaciones³.

Podemos concluir, pues, que esta técnica es segura, no invasiva, válida, reproducible y, además, de fácil ejecución con disponibilidades mínimas de material, siempre que se realice de forma adecuada. La técnica supone una forma útil de estudiar el proceso inflamatorio en los asmáticos y de seguir su evolución. Futuros estudios definirán su utilidad en el seguimiento y en la evaluación de los cambios terapéuticos en el asma.

BIBLIOGRAFÍA

- Holgate ST, Howell JBL, Burney PGJ, Drazen M, Hargreave FE, Kay AB et al. El papel de los procesos inflamatorios en la hiperreactividad de las vías aéreas (1.ª ed. esp.). Oxford: Ed. Blackwell Scientific Publications, 1991.
- Sont JK, Van Krieken JHJM, Evertse CE, Hooijer R, Willems LNA, Sterk PJ. Relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsy specimens and clinical severity of asthma in patients treated with inhaled steroids. *Thorax* 1996; 51: 496-502.
- Motojima S, Akutsu I, Fukuda T, Makino J, Takatsu K. Clinical significance of measuring levels of sputum and serum PCE and serum IL-5 in bronchial asthma. *Allergy* 1993; 48: 98-106.
- Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM, Mattoli S, Kay JM, Dolovich J et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989; 44: 693-699.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-29.
- Fahy JV, Jane L, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1.126-1.131.
- Virchow JC Jr, Hülscher V, Virchow C Sr. Sputum PCE levels correlate with parameters of airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 604-606.
- Hargreave FE, Popov T, Kidney J, Dolovich J. Sputum measurements to assess airway inflammation in asthma. *Allergy* 1993; 48: 81-83.
- Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Powers P, Hargreave FE. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 778-783.
- Popov TA, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punt-hakee Z, Dolovich J et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; 8: 559-565.
- Spanevello A, Migliori GB, Gatta A, Neri M, Ind PW. Sputum induction: a method to assess airway inflammation in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 1995; 50: 208-210.
- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996; 9: 1.174-1.180.
- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillame D et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 308-317.
- Casan P, Benlloch E, Duce F, Perpiñá M, Picado C, Sanchis J et al. Diagnóstico del asma: lo fundamental y lo accesorio (Grupo de Asma de SEPAR). *Arch Bronconeumol* 1993; 29 (Supl 2): 1-7.
- International Consensus Report of Diagnosis and Treatment of Asthma. *Eur Respir J* 1992; 5: 601-641.
- Hargreave FE, Dolovich J, Newhouse MT, Barnes PJ, Boulet L-P, Cartier A et al. The assessment and treatment of asthma: a conference report. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 1.098-1.111.
- Fahy JV, Wong H, Lin J, Boushey HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 53-58.
- Spanevello A, Migliori GB, Giudici MR, Landoni CV, Mazzuchelli G, Grandi M et al. Sputum induced and bronchoalveolar lavage in asthmatics: preliminary results on their relationship. *Eur Respir J* 1994; 7: 3.
- Fahy JV, Liu J, Boushey HA. Reproducibility of measurements made in induced sputum from asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1995; 151: 384.
- Grotendorst DC, Sont JK, Van der Marel A, Kluin-Nelemans J, Van Krieken JHJM, Willems LNA et al. Cellular markers of airway inflammation in asthma: induced sputum versus bronchial biopsies, bronchial wash (BW) and bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 1995; 8 (Supl 19): 7.
- Gibson P, Mattoli S, Dolovich J, Denburg J, Hargreave FE. Airway inflammation in asthma: characterization using sputum analysis and bronchial brushings. *Am Rev Respir Dis* 1994; 149: 247.
- Kidney J, Pizzichini E, Adelroth E, Popov T, Hussack P, Efthimiadis A et al. Comparison of sputum, bronchoalveolar lavage and blood inflammatory cells in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1995; 151: 384.
- Pizzichini MMM, Popov T, Pizzichini E, Hussack P, Efthimiadis A, Dolovich J et al. Spontaneous and induced sputum compared. *E Am Rev Respir Dis* 1995; 151: 385.
- Efthimiadis A, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Weston S, Dolovich J et al. The influence of cell viability and squamous epithelial cell contamination on the reliability of sputum differential cell counts. *Am Rev Respir Dis* 1995; 151: 384.
- Fahy JV, Wong HH, Liu J, Boushey HA. Comparison of markers of inflammation in induced sputum, bronchial wash, and bronchoalveolar lavage from healthy and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1994; 149: 571.
- Dimakou K, Roisman GL, Wils J, Pigner D, Dusser DJ. Cell population in sputum of patients with asthma and COPD and its relationship with lung function. *Eur Respir J* 1995; 8 (Supl 19): 472.
- Kips JC, Ryttilä PH, Peleman RA, Joos GF, Pauwels RA. Evaluation of within subject variability in sputum cell counts. *Am Rev Respir Dis* 1995; 151: 386.
- Pizzichini E, Morris MM, Efthimiadis A, Evans S, Pizzichini MMM, Dolovich J et al. Reproducibility and validity of sputum fluid phase examination. *Am Rev Respir Dis* 1995; 151: 385.