

El cepillado protegido bacteriológico en pacientes con EPOC severa

R. Zalacain, V. Achótegui, I. Pascal, J. Camino, J. Barrón* y V. Sobradillo

Servicios de Neumología y *Microbiología. Hospital de Cruces. Vizcaya.

El objetivo de este estudio ha sido conocer mediante el empleo de una técnica de alta fiabilidad cómo es el catéter telescópico con cepillado bacteriológico (CT), la presencia de gérmenes y su concentración en un grupo de pacientes con EPOC severa ($FEV_1 < 50\%$), unos en fase de estabilización clínica y otros con datos clínicos de agudización.

Se incluyeron 26 pacientes con EPOC severa, 14 estables y 12 agudizados. Ninguno había recibido tratamiento previo con antibióticos o corticoides. Los estables no tenían ningún dato clínico de exacerbación y los agudizados tenían aumento de disnea, del volumen del esputo y de la purulencia del mismo. El CT se realizó con anestesia en aerosol, sin emplear anestesia líquida. Se consideró el CT positivo cuando había $\geq 10^3$ UFC/ml.

No hubo diferencias entre los grupos en cuanto a edad, sexo, proporción de fumadores y ex fumadores, y paquetes/año. En los valores espirométricos tampoco hubo diferencias salvo en la relación FEV_1/CVF que fue menor en los agudizados ($p < 0,05$). El CT fue positivo en el 57,1% de los estables y en el 66,7% de los agudizados ($p = NS$). *H. influenzae* fue el microorganismo hallado en mayor número en ambos grupos. El número medio de UFC/ml fue de 8.625 en los estables y 17.375 en los agudizados ($p = NS$).

Un elevado número de pacientes (57,1%) con EPOC severa en fase de estabilización clínica presentaron gérmenes en concentraciones significativas mediante el empleo de CT. Por otro lado, con esta misma técnica, en otro grupo de pacientes con EPOC severa, de similares características, pero con datos clínicos de agudización, se hallaron gérmenes en el 66,7% no siendo la diferencia significativa, y se confirmó la falta de correlación clínico-bacteriológica.

Palabras clave: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Cepillado protegido.

Arch Bronconeumol 1997; 33: 16-19

Introducción

El papel que desempeñan las bacterias en el desarrollo y evolución de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es todavía incierto y desconocido¹.

Correspondencia: Dr. R. Zalacain.
Servicio de Neumología. Hospital de Cruces.
48903 Cruces. Baracaldo.

Recibido: 27-2-96; aceptado para su publicación: 21-5-96.

The protected specimen brush technique in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease

To determine the presence of germs and their concentration in a group of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) ($FEV_1 < 50\%$), some of whom were in stable condition and others of whom were in acute phase.

Twenty-six patients with severe COPD (14 stable and 12 acute phase) were enrolled. None had received prior antibiotic or corticoid treatment. The stable patients had no signs or symptoms of exacerbation, whereas the acute-phase patients had increased dyspnea, sputum volume and purulence. The patients received aerosol rather than liquid anesthesia when PSB sampling was performed. A PSB finding was considered positive at a level $\geq 10^3$ CFU/ml.

There were no significant differences between the groups with respect to age, sex, proportion of smokers and ex-smokers or packs per year. The only spirometric measure that was significantly different was (FEV_1/FVC , which was lower in the acute-phase group ($p < 0.05$)). Positive PSB findings were recorded for 57.1% of the stable patients and for 66.7% of the acute-phase patients ($p = NS$). *H. influenzae* was the microorganism found most often in both groups. The mean CFU/ml level was 8,625 in stable patients and 17,375 in acute-phase patients ($p = NS$).

A large proportion of stable patients (57.1%) with severe COPD harbor significant concentrations of germs as revealed by PSB sampling. Germ concentrations were found in a non significantly greater number of acute-phase patients, confirming the lack of congruence between clinical status and bacteriological condition.

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Protected specimen brush.

Pese a todo lo que se ha escrito y publicado, parece que la infección bacteriana únicamente es la causa de un 50% de las exacerbaciones de la EPOC¹⁻⁵, y que entre un 50 y 100% de los pacientes con EPOC albergan gérmenes en sus vías aéreas⁶⁻⁸, cifras que serían mayores en los pacientes que tienen una EPOC severa⁹⁻¹¹. Pero todos estos datos se han obtenido empleando técnicas poco específicas y, además, sin hacer cultivos cuantitativos¹²⁻¹⁴.

El catéter telescópico con cepillado bacteriológico (CT) es una técnica altamente sensible y específica en el aislamiento de gérmenes situados en el tracto respiratorio inferior, que evita la contaminación orofaríngea¹⁵. Este método diagnóstico se ha utilizado escasamente en el estudio de pacientes con EPOC^{4,5,16-18}, y en ningún caso en un estudio específico en pacientes con EPOC severa ($FEV_1 < 50\%$)¹⁹.

El objetivo de nuestro estudio ha sido conocer, mediante el empleo de una técnica de alta fiabilidad, cómo es el CT, la presencia de gérmenes y su concentración en un grupo de pacientes con EPOC severa, unos en fase de estabilización y otros con datos de exacerbación.

Material y métodos

Entre el 30 de junio de 1993 y el 31 de diciembre de 1994 se incluyeron en el estudio 26 pacientes con datos clínicos de broncopatía crónica y presencia de obstrucción bronquial severa en la espirometría ($FEV_1 < 50\%$, junto con FEV_1/CVF

TABLA I
Valores espirométricos de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica estables (n = 14)

	\bar{x}	DE	Límites
FEV_1 (l)	1,14	± 0,20	0,80-1,59
Porcentaje de FEV_1 teórico	39,1	± 6,3	28-49
CVF (l)	2,46	± 0,65	1,4-3,50
Porcentaje de CVF teórico	60,3	± 12,8	42-83
FEV_1/CVF (%)	47,1	± 10,8	33-65
PBD* (%)	3,7	± 2,8	0-8

*Prueba broncodilatadora: aumento en tanto por ciento del FEV_1 tras la broncodilatación.

TABLA II
Gérmenes hallados en el cepillado bacteriológico en concentraciones $\geq 10^3$ UFC/ml

Gérmenes	EPOC estables	EPOC agudizados
<i>Haemophilus influenzae</i>	4	4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	-
<i>Escherichia coli</i>	1	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	-	1
<i>Streptococcus viridans</i>	3	1

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

TABLA III
Valores espirométricos de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica agudizados (n = 12)

	\bar{x}	DE	Límites
FEV_1 (l)	0,99	± 0,27	0,70-1,60
Porcentaje de FEV_1 teórico	34,1	± 7,7	22-45
CVF (l)	2,51	± 0,50	1,65-3,30
Porcentaje de CVF teórico	59,5	± 8,6	48-74
FEV_1/CVF (%)	39,6	± 6,4	27-48
PBD* (%)	3,4	± 3,7	0-8

*Prueba broncodilatadora: aumento en tanto por ciento del FEV_1 tras la broncodilatación.

< 70% y prueba broncodilatadora < 10%)¹⁹. A estos pacientes se les practicó una broncoscopia para la toma de muestras bacteriológicas mediante un CT. Todos los pacientes fueron informados previamente a la realización de la prueba de que se les iba a tomar una muestra bronquial para cultivo bacteriológico y todos dieron su consentimiento.

Antes de la realización de la prueba, 24 h previas como máximo, se les practicaron una espirometría y una radiografía de tórax. En esta última no debían apreciarse infiltrados de ningún tipo, ni tampoco lesiones indicativas de bronquiectasias.

Ninguno de los pacientes había presentado hemoptisis previa, ni había sido tratado con antibióticos los 15 días anteriores, ni con corticoides orales los 3 meses previos, ni había estado ingresado en un hospital los 6 meses anteriores.

Los pacientes fueron divididos en función de sus datos clínicos en 2 grupos. El grupo I lo formaban sujetos estables. No tenían ningún dato clínico de exacerbación, con esputo mucoso en todos los casos. Y el grupo II estaba formado por pacientes agudizados. Tenían tres datos clínicos: aumento de disnea, del volumen de esputo y éste era purulento²⁰.

Se utilizó un fibroscopio de 6 mm (Machida FBS-6TL) y para la realización del CT se empleó anestesia en aerosol (10 ml de lidocaína al 5%) durante 15 min previos a la broncoscopia, sin que se empleara en ningún caso anestesia nasal ni tampoco anestesia líquida ni en la orofaringe ni en la subglotis, para evitar la contaminación traqueobronquial por el arrastre de gérmenes. El CT fue realizado según la técnica descrita por Wimberley et al¹⁵, y se hizo el cepillado en el lóbulo inferior derecho. La muestra obtenida se remitió disuelta en una solución de 1 ml de Ringer lactato, en un tiempo inferior a 10 min, al laboratorio de microbiología, donde se hicieron cultivos cuantitativos para bacterias aerobias y anaerobias, así como cultivo para *Legionella*. El CT se consideró positivo cuando en el cultivo se hallaron gérmenes en concentraciones $\geq 10^3$ UFC/ml¹⁵, siempre que hubiese además ausencia de células escamosas de vías altas.

El análisis estadístico se realizó empleando el test de la t de Student para las variables cuantitativas, y el test de la χ^2 , y el de Fisher cuando era necesario, para las variables cualitativas. Los datos fueron expresados como valores medios y desviación estándar. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

De los 26 pacientes incluidos en el estudio, 14 presentaban una estabilización de su EPOC y los 12 restantes una agudización. Los 14 pacientes estables tenían una edad de $67,3 \pm 7,4$ años (límites: 56-84); todos eran varones; cinco eran fumadores y nueve ex fumadores, con una media de $60,1 \pm 8,8$ paquetes/año (límites: 45-80); todos fueron ambulatorios. Los valores espirométricos se muestran en la tabla I, siendo el valor medio del $\%FEV_1$ de $39,1 \pm 6,3$. El CT fue positivo en 8 pacientes (57,1%). Los gérmenes hallados se muestran en la tabla II, y fue *H. influenzae* el microorganismo hallado en mayor número de casos (4/8). En un paciente se hallaron 2 gérmenes, *H. influenzae* y *S. viridans*. El número medio de UFC/ml hallado fue 8.625 ± 15.923 (límites: 2.000-50.000). Hubo un único caso en que se halló un germen en concentraciones $> 10^4$ UFC/ml, que correspondió a un caso de *H. influenzae*. Hubo además un paciente que tuvo una concentración de 10^2 UFC/ml de *Neisseria* sp., y los cinco restantes no tenían ningún microorganismo en el cultivo del CT.

Los 12 pacientes agudizados tenían una edad de $67,7 \pm 5,3$ años (límites: 59-74). Todos eran varones, cinco eran fumadores y siete ex fumadores, con una media de $67,3 \pm 10,8$ paquetes/año (límites: 48-90); siete eran ambulatorios y los cinco restantes habían acudido a urgencias del hospital, haciéndoles el CT en ese momento. Los valores espirométricos se muestran en la tabla III, siendo el valor medio del $\%FEV_1$ de $34,1 \pm 7,7$. El CT fue positivo en 8 pacientes (66,7%). Los gérmenes hallados se muestran en la tabla II, siendo *H. influenzae* el microorganismo hallado en mayor número de casos (4/8). En un paciente se hallaron 2 gérmenes, *H. influenzae* y *N. meningitidis*. El número medio de UFC/ml hallado fue 17.375 ± 20.980 (límites: 2.000-50.000). Hubo 3 casos en que la concentración de gérmenes fue $> 10^4$ UFC/ml, que correspondieron a 3 *H. influenzae*. Hubo, además, 2 pacientes que tuvieron una concentración $< 10^3$ UFC/ml (10^2 *Neisseria* sp. y 5×10^1 *Corynebacterium* sp., respectivamente). Los otros pacientes no tuvieron ningún microorganismo en el CT.

Al comparar ambos grupos (estables y agudizados) no hubo diferencias significativas en cuanto a la edad, la proporción de fumadores y ex fumadores, y los paquetes/año. En los valores espirométricos tampoco hubo diferencias salvo en la relación FEV_1/CVF , que fue menor en los agudizados ($p < 0,05$). Al valorar los resultados del CT, tanto el número de casos positivos (el 66,7 frente al 57,1%) como el número de UFC/ml (17.375 frente a 8.625) fueron mayores en los pacientes agudizados, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Discusión

Es un hecho reconocido que algunos pacientes con EPOC albergan gérmenes en sus vías aéreas inferiores^{1,8}. Esta presencia de población bacteriana vendría fundamentalmente motivada por una alteración del sistema mucociliar^{6,21}. En los pacientes con EPOC severa, cabría esperarse que esta alteración fuese mayor, por lo que un mayor número de pacientes podría tener gérmenes en sus vías bajas⁹⁻¹¹. Así mismo, es conocido que una de las causas que originan exacerbación es la infección bacteriana^{1,2}, y que ésta es más común en los pacientes con EPOC severa⁹⁻¹¹.

Pero lo que no está cuantificado es el número de pacientes con EPOC severa que tienen gérmenes en sus vías inferiores, así como el tipo de gérmenes, ni tampoco se sabe cuántas exacerbaciones en estos pacientes son de causa infecciosa, ni la clase de gérmenes que los originan²².

Habitualmente, a la hora de valorar la flora bacteriana en pacientes con EPOC, tanto en los estables como en los agudizados se han empleado técnicas con poca fiabilidad diagnóstica, como el esputo^{3,12} y la punción transtraqueal (PTT)^{13,14,23}. El esputo no parece adecuado debido al arrastre de microorganismos presentes en la cavidad orofaríngea y la PTT es una técnica que tiene el inconveniente de su baja especificidad.

Por todo ello, sería necesario el empleo de una técnica de alta fiabilidad, como es el CT, que reúne las con-

diciones de sensibilidad y especificidad. El problema de esta técnica es que para su correcta realización requiere el empleo de anestesia en aerosol, con lo que la tolerancia puede ser peor. Este tipo de anestesia en aerosol ha sido aconsejado desde que se introdujo la técnica¹⁵, y aunque no hay ningún trabajo que lo asegure, parece que con este tipo de anestesia se podría evitar la contaminación traqueobronquial con arrastre de gérmenes que puede producir la anestesia líquida. La realidad es que si se hace bien la aerosolización y el CT es realizado por un médico experto, la prueba es bien tolerada como ocurrió en nuestro estudio, no teniendo ninguna complicación pese a ser pacientes con una EPOC muy evolucionada.

En la realización del estudio fue fundamental la selección de los pacientes. En ninguno de los dos grupos hubo factores que podrían cambiar la flora bacteriana, como la toma reciente de antibióticos o corticoides, así como la estancia hospitalaria. En los pacientes estables, ninguno presentó aumento de disnea, esputo purulento o aumento del volumen de esputo, ni hemoptisis. En la visualización broncoscópica las secreciones fueron blanquecinas en todos los casos.

Con todas estas premisas el CT fue positivo, encontrándose gérmenes en concentraciones significativas en el 57,1%. *H. influenzae* (4 casos) fue el microorganismo hallado en mayor número, no habiendo ningún caso de *S. pneumoniae*. Si comparamos nuestros datos con otras series^{5,16,17}, vemos que en éstas el CT fue positivo entre el 25 y el 50% de los casos. El estudio con el que mejor podemos comparar nuestros datos es el de Monsó et al⁵, en que, empleando una sistemática parecida, encontraron gérmenes en un 25% de los casos, pero sin hacer referencia al grado de obstrucción bronquial. *H. influenzae* fue el germen que hallaron en mayor número de casos, seguido de *S. pneumoniae*. En los otros dos estudios^{16,17} son difíciles de contrastar los resultados, ya que los criterios de selección no están claramente expuestos, y en uno de ellos se empleó anestesia líquida¹⁷. Con nuestros datos vemos que un número importante de pacientes con EPOC severa (57,1%) albergan gérmenes en sus vías aéreas inferiores, en concentraciones significativas ($\geq 10^3$ UFC/ml). Este número de UFC/ml es considerado como indicativo de infección¹⁵, pero es evidente que esto no se corresponde con una respuesta clínica, ya que estos pacientes estaban totalmente estables desde un punto de vista clínico.

Los pacientes agudizados tenían los tres criterios descritos por Anthonisen et al²⁰: aumento de la disnea, del volumen de esputo y de la purulencia del mismo. Con estas condiciones, el CT fue positivo en el 66,7%, siendo nuevamente *H. influenzae* (4 casos) el microorganismo más frecuente, destacando la presencia de gérmenes más agresivos como *Acinetobacter* y *Pseudomonas aeruginosa*. No hubo, sin embargo, ningún caso de *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis*, microorganismos que, junto con *H. influenzae*, son descritos como los agentes bacterianos que más frecuentemente causan exacerbación bacteriana^{9,24,25}. Hubo también un caso de *S. viridans*, microorganismo que, aunque habitualmente se consideraba un patógeno comensal, es sabido que puede

ser causa de exacerbaciones^{4,23} e incluso de neumonía²⁶ en este tipo de pacientes. Si comparamos nuestros datos con otras series^{4,5,18}, en éstas el CT fue positivo entre el 44 y el 75% de los casos, pero en ninguna de ellas aclaran el grado de obstrucción bronquial. En el estudio de Monsó et al⁵, el más similar al nuestro, el CT fue positivo en el 51,7% de los casos, siendo *H. influenzae* y *S. pneumoniae* los gérmenes más frecuentes.

Con nuestros datos, vemos que en un grupo de pacientes agudizados, en que por los criterios de selección cabría esperar que la exacerbación fuese bacteriana, esto no ha sido así, ya que el CT sólo fue positivo en el 66,7%, y se confirmó el dato recientemente descrito de que la purulencia de las secreciones no tiene que ser sinónimo de infección bacteriana²⁷.

Al comparar los resultados obtenidos con el CT en ambos grupos (estables y agudizados), aunque el número de casos positivos y el de UFC/ml fueron mayores en los pacientes agudizados, las diferencias no fueron significativas. Es evidente que la gran diferencia que había desde un punto de vista clínico no se correlacionó con los hallazgos bacteriológicos obtenidos en el CT, confirmando la discrepancia clínico-bacteriológica que existe a la hora de evaluar los conceptos de estabilización y agudización en estos pacientes con EPOC^{22,28}.

Según nuestros resultados, podemos concluir que un elevado número de pacientes (57,1%) con EPOC severa, en fase de estabilización clínica, presentan gérmenes en concentraciones significativas mediante el empleo de CT. Por otro lado, con esta misma técnica, en otro grupo de pacientes con EPOC severa, de similares características, pero con datos clínicos de agudización, se hallaron gérmenes en el 66,7%, no siendo la diferencia significativa, confirmando la falta de correlación clínico-bacteriológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1.067-1.083.
- Tager I, Speizer FE. Role of infection in chronic bronchitis. *N Engl J Med* 1975; 292: 563-571.
- Chodosh S. Acute bacterial exacerbations bronchitis and asthma. *Am J Med* 1987; 82 (Supl 4 A): 154-163.
- Fagon JY, Chastre J, Trovillet JL, Domart Y, Dombret MC, Borner M et al. Characterization of distal bronchial microflora during acute exacerbation of chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1.004-1.008.
- Monsó E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1.316-1.320.
- Palmer LB. Bacterial colonization. Pathogenesis and clinical significance. *Clin Chest Med* 1987; 8: 455-467.
- Martínez JA, Bugés J, Rodríguez E. La infección bronquial y su tratamiento en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol* 1992; 8: 247-252.
- Elborn JS, Shale DJ. Infections of the airways. *Curr Opin Infect Dis* 1992; 5: 170-175.
- Ball P. Epidemiology and treatment of chronic bronchitis and its exacerbations. *Chest* 1995; 108 (Supl): 43-52.
- Cole P, Wilson R. Host-microbial interrelationships in respiratory infection. *Chest* 1989; 95: 217-221.
- Smith CB, Golden CA, Kanner RE, Renzetti AD. *Haemophilus influenzae* and *Hemophilus parainfluenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1976; 1: 1.253-1.255.
- Gross NJ. Chronic obstructive pulmonary disease. Current concepts and therapeutic approaches. *Chest* 1990; 97 (Supl): 19-23.
- Irwin RS, Erickson AD, Pratter MR, Corrao WM, Garrity FL, Myers JR et al. Prediction of tracheobronchial colonization in current cigarette smokers with chronic obstructive bronchitis. *J Infect Dis* 1982; 145: 234-241.
- Bjerkestrand M, Digranes A, Schreiner A. Bacteriological findings in transtracheal aspirates from patients with chronic bronchitis and bronchiectasis. *Scand J Respir Dis* 1975; 56: 201-207.
- Wimberley NW, Bass JB, Boyd BW, Kirkpatrick MB, Serio RA, Pollock HM. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 1982; 81: 556-562.
- Torres A, Celis R, Xaubet A, Puig de la Bellacasa J, Agustí C, González J et al. Distal airway flora colonizing populations of risk. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 543.
- Vereen L, Smart LM, George RB. Antibody coating and quantitative cultures of bacteria in sputum and bronchial brush specimens from patients with stable chronic bronchitis. *Chest* 1986; 90: 534-536.
- Martínez JA, Rodríguez E, Bastida T, Bugés J, Torres M. Quantitative study of the bronchial bacterial flora in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 1994; 105: 976.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 225-244.
- Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CPW, Hershfield ES, Harding GKM, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987; 106: 196-204.
- Wilson R. Outcome predictors in bronchitis. *Chest* 1995; 108 (Supl): 53-57.
- Sachs FL. Chronic bronchitis. En: Pennington JE, editor. *Respiratory infections: diagnosis and management*. Nueva York: Raven Press, 1989; 142-158.
- Irwin RS, Corrao WM, Erickson AD, Pratter MR, Garrity FL, Kammerlen JT. Characterization by transtracheal aspiration of the tracheobronchial microflora during acute exacerbations of chronic obstructive bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121 (Supl): 150.
- Nicotra MR, Rivera M. Chronic bronchitis: when and how to treat. *Semin Respir Infect* 1988; 3: 61-71.
- Haas H, Morris JF, Samson S, Kilbourn JP, Kim J. Bacterial flora of the respiratory tract in chronic bronchitis: comparison of transtracheal, fiberbronchoscopic and oropharyngeal sampling methods. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 41-47.
- Marrie TJ, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 586-599.
- Sachs APE, Koeter GH, Groenier KH, Van der Waaij D, Schiphuis J, Meyboom de Jong B. Changes in symptoms, peak expiratory flow, and sputum flora during treatment with antibiotics of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease in general practice. *Thorax* 1995; 50: 758-763.
- Jansen HM, Sachs APE, Van Alphen L. Predisposing conditions to bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2.073-2.080.