

BACTERIAS RECUBIERTAS DE ANTICUERPOS EN EL ESPUTO

C. Sala-Mateus, J. Puig de la Bellacasa, A. Torres, L. Hojman, M.T. Jiménez de Anta y A. Agustí Vidal.

Servicios de Neumología y Microbiología. Hospital Clínico y Provincial. Barcelona.

La detección de bacterias recubiertas de anticuerpos, mediante antigammaglobulinas humanas marcadas, en las secreciones del tracto respiratorio, ha sido propuesta como una técnica para identificar la infección bacteriana pulmonar. Este trabajo ha sido planificado para estudiar su valor diagnóstico en el esputo. Se estudian 14 muestras de esputos procedentes de pacientes con neumonía bacteriana y otras 14 de pacientes con otras bronconeumopatías. La sensibilidad de la técnica para el diagnóstico de las neumonías bacterianas fue del 86 %, con una especificidad del 43 %. Ello sugiere que dicha técnica no diferencia las bacterias que infectan las vías respiratorias de las que lo hacen en el parénquima pulmonar; aunque sí diferencia las bacterias que contaminan las muestras de esputo de las que causan infección. En nuestra serie, la toma previa de antibióticos no modificó los resultados. Las muestras más aptas para este estudio son las que contienen más de 25 leucocitos por campo ($\times 100$). Finalmente, no se observaron diferencias en los resultados obtenidos en cada muestra empleando anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM y el tiempo requerido para su positivización no incidió en el resultado, todo ello sugiere que la respuesta inmunitaria local pulmonar fue de tipo secundario.

Arch Bronconeumol 1989; 25: 14-17

Introducción

El estudio microbiológico del esputo en el diagnóstico de la infección pulmonar, la mayoría de autores lo consideran de poca utilidad por la contaminación que se produce a su paso por la cavidad orofaríngea¹. Por ello, se han propuesto diferentes técnicas para obviar dicha contaminación. Sin embargo, estas técnicas se han empleado de forma indistinta en pacientes con infección de las vías aéreas y del parénquima pulmonar con resultados similares²⁻⁵. La detección de bacterias recubiertas de anticuerpos (BRA), inicialmente se aplicó a muestras de orina, para diferenciar las infecciones urinarias altas de las bajas, con buenos resultados⁶⁻⁷, aunque no todos los autores están de acuerdo con ello⁸. Winterbauer et al⁹ fueron los primeros en aplicar esta técnica a muestras de secreciones respiratorias, con excelentes resultados. Para estudiar su rentabilidad diagnóstica, nosotros la hemos aplicado a muestras de esputo de un grupo de pacientes con neumonía bacteriana, tomando como control a un grupo de pacientes con otras bronconeumopatías.

Recibido el 18-7-1988 y aceptado el 19-10-1988.

Bacteria coated with antibodies in the sputum

The detection by labeled human anti-gamma globulins of bacteria coated with antibodies in the secretions of the respiratory tract has been proposed as a method for identifying bacterial infections of the lung. The aim of the present work is to assess its diagnostic value in sputum samples. Fourteen sputum samples obtained from patients with bacterial pneumonia and 14 sputum samples from patients with other bronchopneumopathies were studied. Sensitivity and specificity of the method for diagnosing bacterial pneumonia were 86 % and 43 %, respectively, suggesting that such method do not distinguish between bacteria infecting airways from bacteria infecting lung parenchyma, but it allows to differentiate bacteria contaminating sputum samples from those causing infection. In our series, the previous treatment with antibiotics did not modify the results. The most appropriate samples for being studied are those containing more than 25 leukocytes per field ($\times 100$). Finally, there were no differences in the results obtained in each sample employing anti-IgG, anti-IgA, or anti-IgM. The time required for positivation did not have any influence on the result, suggesting that the local immune response of the lung was of secondary type.

Material y métodos

La población estudiada ha sido de 14 pacientes afectados de neumonía bacteriana, cuyo diagnóstico etiológico se obtuvo mediante hemocultivo, cultivo del líquido pleural o de la punción pulmonar. Sus características están descritas en la tabla I. Como grupo control, se estudiaron 14 muestras de esputo procedentes de pacientes con otras patologías respiratorias, cuyas características están descritas en la tabla II.

Las muestras de esputo estudiadas llegaron al Laboratorio de Microbiología de forma rutinaria. De todas ellas se tomó una muestra de la zona de máxima purulencia macroscópica, y se practicó una tinción de Gram. Esta se leyó a 100 aumentos, con la que se realizó un conteo de los leucocitos y células epiteliales presentes, según la clasificación descrita en la tabla III^{10,11} y luego era leída a 1.000 aumentos para el estudio microbiológico. Cuando el clínico así lo había solicitado y la lectura a 100 aumentos evidenciaba que era representativa del foco infeccioso, se cultivaba en agar-sangre, agar-chocolate y McConkey. La identificación de los microorganismos se realizó según las técnicas habituales. Sin conocer la orientación diagnóstica del paciente, ni el resultado de los cultivos, se practicó la técnica de inmunofluorescencia. La metodología seguida fue la siguiente: se recogieron 0,5 ml de la muestra de esputo, escogiendo la zona de máxima purulencia macroscópica, a los que se añadió 5 ml de una solución tamponada de fosfato (PBS) a pH de 7,3. Se homogeneizó vigorosamente en un mezclador (Gri Cel[®]) y se centrifugó a



TABLA I
Características de los pacientes con neumonía y resultados

Casos	Edad	Enfermedades subyacentes	Días de evolución	Tratamiento previo	Espuito: Tinción de Gram Grado*	Cultivo	BRA	Técnica de referencia	
1	76	Psicosis	1	No	5	CGP (Str y Stf), BGN y CGN	<i>S. aureus</i>	(+) cocos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
2	60	No	3	No	5	CGP (Str)	<i>S. pneumoniae</i>	(+) cocos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
3	42	Bronquitis cr. Enolismo	3	No	5	CGP (Str), BGN y CGN	<i>S. pneumoniae</i>	(+) cocos y bacilos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
4	53	Bronquitis cr.	2	No	4	CGP (Str), BGN y CGN	<i>S. pneumoniae</i>	(+) cocos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
5	77	Enolismo	5	Cefamandol	1	CGP (Str y Stf), BGN y levaduras	estreptococo α -hemolítico	(+) cocos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
6	88	No	15	Penicilina	5	CGP (Str)	<i>S. pneumoniae</i>	(+) cocos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
7	52	Insuf. renal Hemodiálisis	15	No	6	CGP (Str) y BGN	<i>S. pneumoniae</i>	Negativo	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
8	54	Enolismo	—	Cefotaxima Amikacina	5	BGN, CGP (Str) y CGN	<i>K. pneumoniae</i>	(+) bacilos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
9	83	Bronquitis cr.	7	Cefamandol	5	BGN	<i>K. pneumoniae</i>	(+) bacilos	Hemocultivo: <i>S. pneumoniae</i>
10	83	Neoplasia de colon	20	No	5	CGP (Str), BGN y CGN	estreptococo α -hemolítico	(+) cocos	Hemocultivo: <i>S. faecalis</i>
11	34	Colecistectomía	3	No	2	BGN, CGP (Str y Stf) y CGN	No se realizó	Negativo	Hemocultivo: <i>B. fragilis</i>
12	48	Insuf. renal Hemodiálisis	60	No	5	BGN	<i>S. marcescens</i>	(+) bacilos	L. pleural: <i>S. marcescens</i>
13	35	Bronquiectasias	90	Cefotaxima Netilmicina	5	CGP (Str y Stf), BGN y CGN	No se realizó	(+) cocos y bacilos	Punción pulmonar: <i>S. aeruginosa</i>
14	40	Bronquiectasias Enolismo	20	Cefamandol Clindamicina	5	BGN, CGP (Str) y filamentos	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i> y estreptococo α -hemolítico	(+) cocos bacilos y filamentos	Punción pulmonar: <i>P. aeruginosa</i> Serología: <i>A. fumigatus</i>

CGP = Cocos gram-positivos; BGN = Bacilos gram-negativos; CGN = Cocos gram-negativos; Str = Estreptococos y Stf = Estafilococos; (*) Según la citología presente.

1.000 g (Labofuge Hereaus¹) durante 10 minutos. Desechando el sobrenadante se repitió la operación. El sedimento se extendió en un portaobjetos con varios pocillos, se añadió una microgota de una solución al 20 % de anticuerpos anti-gammaglobulina humana monoespecífica (anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM) marcados con fluoresceína (Instituto Berhing SA); y como control negativo, en un cuarto pocillo se añadió una microgota de una solución al 20 % de anticuerpos anti-albúmina humana, también marcados con fluoresceína (Instituto Berhing SA). La preparación se dejó incubar en cámara húmeda, en una estufa a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se lavó con PBS en un agitador (Agitador Rotativo Atom 80²) durante 10 minutos, tres veces seguidas. La lectura se realizó en microscopía de fluorescencia (Leitz Wetzlar³). Se consideraron positivas aquellas muestras en las que se demostraron 5 o más bacterias fluorescentes por campo (x1.000), siempre que en el control resultara negativa.

Resultados

Los resultados obtenidos en las muestras de esputo procedentes de los pacientes del grupo con neumonía, se presentan en la tabla I. En todas las muestras estudiadas, la tinción de Gram detectó la presencia de microorganismos. El cultivo se realizó en todas las muestras excepto en la 12 y 13; y aisló un predominio de microorganismos potencialmente patógenos en 10 de los 12 cultivos, todos ellos coincidieron con el resultado obtenido en la técnica tomada como referencia, excepto en el caso 1. La técnica de inmunofluorescencia resultó positiva en 12 muestras y la morfología de-

tectada coincidió con el microorganismo aislado en la técnica de referencia, aunque en los casos 3, 13 y 14 se detectaron además otras BRA. De las tres muestras (casos 5, 7 y 11) con menos de 25 leucocitos por campo (x 100), dos resultaron negativas con la técnica de inmunofluorescencia, pues aunque en ambas se detectaron BRA, lo fueron en número inferior al exigido. En las seis muestras de esputo, obtenidas de pacientes que habían iniciado el tratamiento antibiótico, la técnica resultó positiva. Los pacientes de este grupo con neumonía, que referían un menor tiempo de evolución de la enfermedad eran, el caso 1 con 24 horas, el 4 con 48 y los pacientes 2, 3 y 11 con 72 horas, en todos ellos la técnica de inmunofluorescencia resultó positiva.

Los resultados obtenidos en las muestras de esputo de los pacientes del grupo control están descritos en la tabla II. La tinción de Gram detectó la presencia de microorganismos en todas las muestras. El cultivo se realizó en siete casos y en tres de ellos (casos 3, 5 y 14) aisló bacterias potencialmente patógenas. La técnica de inmunofluorescencia resultó positiva en 6 casos, de los que sólo la muestra del paciente 3 correspondía a las muestras con cultivo positivo para patógenos potenciales. En las muestras de esputo de los pacientes 2, 5, 8 y 10 también se detectaron BRA, aunque en número inferior al exigido para interpretar la técnica como positiva. En este grupo control, se estudiaron 4 muestras con menos de 25 leucocitos por campo (x 100), dos de ellas (casos 3 y 12) resultaron positivas y las dos restantes negativas, aunque en el caso 2, por detectar menos de 5 BRA por campo



TABLA II
Características de los pacientes del grupo control y resultados

Casos	Edad	Enfermedades subyacentes	Días de evolución	Tratamiento previo	Espuito: Tinción de Gram Grado*	Gram Microbiología	Cultivo	BRA
1	55	Abdomen agudo Atelectasia	5	No	1	CGP (Str)	Estreptococo α-hemolítico	Negativo
2	21	Asma Atelectasia	4	No	1	CGP (Str), BGN, CGN y levaduras	No se realiza	Negativo
1	55	Abdomen agudo Atelectasia	5	No	1	CGP (Str)	Estreptococo α-hemolítico	Negativo
3	76	Diabetes Bronquitis cr.	7	Amoxicilina	6	CGP (Str), BGN y CGN	<i>S. pneumoniae</i>	(+) cocos
4	56	Bronquiectasias	30	Ampicilina	5	CGP (Str), BGN y CGN	No se realiza	(+) cocos
5	50	Asma	15	No	5	CGP (Str y Stf), BGN y CGN	<i>P. aeruginosa</i>	Negativo
6	67	Bronquitis cr.	5	Amoxicilina	5	CGP (Str), BGN y CGN	No se realiza	(+) cocos
7	78	Bronquitis cr.	17	Amoxicilina	3	CGP (Str), BGN y CGN	Estreptococo α-hemolítico	Negativo
8	24	Abdomen agudo Atelectasia	2	No	5	CGP (Str) y BGN	Estreptococo α-hemolítico	Negativo
9	83	Insuf. cardíaca	7	No	5	CGP (Str y Stf) BGN y CGN	No se realiza	Negativo
10	40	Bronquiectasias	—	No	5	BGN, CGP (Str) y CGN	No se realiza	Negativo
11	70	Bronquitis cr.	14	Amoxicilina	5	CGP (Str), BGN y CGN	No se realiza	(+) cocos
12	74	Bronquitis cr. Diabetes	30	No	1	CGP (Str), BGN y CGN	Estreptococo α-hemolítico	(+) cocos y bacilos
13	81	Bronquitis cr. Diabetes	2	Cefamandol	3	BGN, CGP (Str) y CGN	No se realiza	(+) cocos y bacilos
14	72	IAM Atelectasia	2	Cefamandol	5	CGP (Str) y BGN	<i>H. influenzae</i>	Negativo

IAM = Infarto agudo de miocardio; CGP = Cocos gram-positivos; BGN = Bacilos gram-negativos; CGN = Cocos gram-negativos; Str = Estreptococos y Stf = Estafilococos; (*) Según la citología presente.

(x 1000). De los 7 casos que habían iniciado el tratamiento antibiótico al obtener la muestra de esputo, únicamente en los casos 7 y 14 la inmunofluorescencia resultó negativa al no detectar BRA.

Los resultados obtenidos con las tres inmunoglobulinas ensayadas (anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM) fueron similares en cada muestra estudiada, excepto en el caso 5 del grupo con neumonía, en que la anti-IgG no detectó BRA, la anti-IgA las detectó en cantidad inferior a 5 por campo (x 1000), y la anti-IgM resultó positiva; y en el paciente 3 del grupo control, en que únicamente la anti-IgG detectó la presencia de BRA.

Discusión

Winterbauer et al⁹ son los primeros en aplicar esta técnica a las secreciones del tracto respiratorio. En esta primera serie, las muestras estudiadas se obtienen mediante fibrobroncoscopia y, tomando como referencia el resultado del cultivo cuantitativo del catéter telescópado, obtienen una sensibilidad

del 73 %, con una especificidad del 98 % para dicha técnica en el diagnóstico de la neumonía bacteriana. Nosotros hemos aplicado esta técnica a muestras de esputo de 14 pacientes con neumonía bacteriana, tomando como referencia técnicas de especificidad máxima reconocida, y a 14 muestras de esputo procedentes de pacientes sin criterios de infección parenquimatosa pulmonar. En nuestra serie, la sensibilidad de la técnica de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la neumonía bacteriana ha sido del 86 %, con una especificidad del 43 %. Esta falta de coincidencia entre nuestros resultados y los obtenidos por Winterbauer et al⁹, los relacionamos con la técnica de obtención de la muestra; mediante el fibrobroncoscopio se pueden obtener secreciones del tracto respiratorio sin que exista una patología broncopulmonar concomitante, sin embargo ésta es necesaria para que el paciente expectore. Una de las causas que explican la presencia de esputo, es la infección de las vías respiratorias y el hecho de que la especificidad haya resultado tan baja, sugiere que las bacterias que infectan las vías respiratorias están recubiertas de anticuerpos. Esta conclusión ya había sido apuntada por nuestro grupo¹² y Vereen et al¹³ han presentado un trabajo en pacientes con bronquitis crónica, en los que se evidencia la presencia de BRA en el esputo. En los pacientes con vía aérea artificial, en los que hay facilidad para la obtención de secreciones respiratorias, nuestros resultados¹⁴ se asemejan a los presentados por Winterbauer et al⁹.

En la tinción de Gram de las muestras de esputo de los pacientes con neumonía, además de los microorganismos responsables de la infección, se evidencian otros, que con la técnica de inmunofluorescencia no se detectan recubiertos de anticuerpos, excepto en los casos 3, 13 y 14 que luego se comentarán; y el hecho de que con el control (anticuerpos anti-albúmina) no se detecten bacterias fluorescentes, es sig-

TABLA III
Criterios de evaluación de la composición citológica

Grado	Leucocitos*	Células epiteliales*
1	< 10	> 25
2	10-25	> 25
3	> 25	> 25
4	> 25	10-25
5	> 25	< 10
6	< 25	< 25

* por campo (x 100)



nificativo de que las bacterias responsables de la infección están recubiertas de anticuerpos, en cambio, las que contaminan la muestra no lo están. El caso 3 del grupo con neumonía, en que la técnica de inmunofluorescencia detectó la presencia de cocos y bacilos, había sido orientado clínica y radiológicamente como neumonía por aspiración, en tal caso la etiología polimicrobiana es frecuente y ello no queda descartado porque el hemocultivo aislara únicamente *Streptococcus pneumoniae*.¹⁵ En las muestras de esputo de los casos 13 y 14 del mismo grupo, también se detectaron formas bacterianas fluorescentes, que no coincidieron con las bacterias aisladas en la técnica de referencia; ambos eran pacientes sometidos a tratamiento antibiótico; y éste puede enmascarar el resultado del cultivo¹⁶.

De las tres muestras de esputo del grupo con neumonía con menos de 25 leucocitos por campo (x 100), dos resultaron negativos, y de las cuatro del grupo control también resultaron negativas dos; así pues, parece evidente que las muestras con más de 25 leucocitos por campo (x 100) son más adecuadas para la aplicación de esta técnica. El tratamiento antibiótico previo no modificó los resultados.

El que la técnica de inmunofluorescencia haya resultado positiva en las muestras de esputo de los pacientes que referían un menor tiempo de evolución de la enfermedad, sugiere que la respuesta inmunitaria local pulmonar ha sido de tipo secundario¹⁷; ello viene refrendado por el hecho de que las tres anti-gammaglobulinas utilizadas han demostrado el mismo resultado en cada muestra estudiada en la mayoría de los casos, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Winterbauer et al.⁹.

BIBLIOGRAFIA

1. Barret-Connor E. The non value of sputum culture in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1971; 103:845-848.
2. Haas H, Morris JF, Samson S, Kilbourn JP, Kim PJ. 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.
3. Bartlett JG, Finegold SM. Bacteriology of expectorated sputum with quantitative culture and wash technique compared to transtracheal aspirates. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:1019-1027.
4. Hayes DA, McCarthy LC, Friedman M. Evaluation of the two bronchofiberoptic methods of culturing the lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122:319-323.
5. Boyd BW, Wimberley NW, Bass JB Jr. A new fiberoptic bronchoscopy technique for diagnosis of pulmonary infections: Clinical results in 50 patients. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121 (suppl): 114.
6. Thomas V, Shelokov A, Forland M. Antibody-coated bacteria in the urine and the side of urinary tract infection. *N Engl J Med* 1974; 290:588-590.
7. Jones SR, Smith JW, Sanford JP. Localization of urinary-tract infections by detection of antibody-coated bacteria in urine sediment. *N Engl J Med* 1974; 290:591-593.
8. Montplaisir S, Courteau C, Roche A. Antibody-coated bacteria in contaminated urine specimens. *N Engl J Med* 1977; 26:758-759.
9. Winterbauer RH, Hutchinson JF, Reinhart GN et al. The use of quantitative cultures and antibody coating of bacteria to diagnose bacterial pneumonia by fiberoptic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:98-103.
10. Murray PR, Washington JR. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clinic Proc* 1975; 50:339-344.
11. Geckler RW, Gremillion DH, McAllister CK, Ellenbogen Ch. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J Clin Microbiol* 1977; 6:396-399.
12. Sala-Mateus C, Puig de la Bellacasa J, Torres A, Almela M, Jiménez de Anta MT, Agustí Vidal A. Valor diagnóstico de las bacterias recubiertas de anticuerpos (BRA) en el esputo de pacientes con neumonía bacteriana. Comunicación 10/17. II Congreso SEIMC. Palma de Mallorca 1986.
13. 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.
14. Sala-Mateus C, Torres A, Puig de la Bellacasa J, Almela M, Jiménez de Anta MT, Agustí Vidal A. Valor de las bacterias recubiertas de anticuerpos (BRA) en las secreciones bronquiales de los pacientes sometidos a intubación y ventilación mecánica (IT-VM) afectos de neumonía bacteriana. Comunicación 10/16. II Congreso SEIMC. Palma de Mallorca 1986.
15. Kanter RK, Carroll JL. Early pneumococcal sepsis after pulmonary aspiration and the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1983; 11:906-907.
16. Spencer RC, Philp JR. Effect of previous antimicrobial therapy on bacteriological findings in patients with primary pneumonia. *Lancet* 1973; 2:349-350.
17. Kaltreider HB. State of the art. Expression of immune mechanisms in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113:347-379.