

Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre el recuento celular en líquido ascítico

L. García Menéndez¹, C. Ciriza de los Ríos², A. Orejas García¹, A. Enguix Armada³, A. L. Fernández Eroles⁴, A. Prieto Blanco¹

Resumen

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre el recuento de leucocitos totales y leucocitos polimorfonucleares en líquido ascítico.

Se realizó un recuento inicial en 47 líquidos ascíticos y se tomaron dos alícuotas de cada uno para su almacenamiento, una de ellas a 4 °C y la otra a 20-25 °C. El recuento se repitió a las 24 y 48 horas.

Tras el recuento inicial, 16 líquidos se clasificaron como infectados y 31 como no infectados. Se observó un descenso progresivo en el recuento celular en las dos condiciones de almacenamiento, pero fue más acusado a 20-25 °C. Todos los líquidos conservados a 4 °C y clasificados inicialmente como infectados permanecieron con un recuento propio de infección tras 24 y 48 horas. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre la variación del propio recuento en cámara y la variación observada tras 24 horas de almacenamiento a 4 °C, tanto para el recuento de leucocitos totales como para el de polimorfonucleares ($p = 0,854$ y $p = 0,073$ respectivamente; prueba de Wilcoxon para muestras apareadas). Se observó diferencia significativa para el recuento de polimorfonucleares en todas las otras condiciones y tiempos de almacenamiento ($p < 0,05$).

Concluimos que el recuento de un líquido ascítico que no pueda realizarse de inmediato puede demorarse 24 horas en líquidos conservados a 4 °C. Ninguna otra condición ni periodo son adecuados para el almacenamiento de dichos líquidos.

Palabras clave: líquido ascítico, recuento de leucocitos polimorfonucleares, almacenamiento.

Introducción

La infección del líquido ascítico es una complicación grave de los pacientes cirróticos. De los posibles tipos de infecciones, las más frecuentes son las que se presentan sin causa aparente y, entre ellas, el prototipo es la peritonitis bacteriana espontánea (PBE). El tratamiento antibiótico de la misma debe ser establecido sobre un diagnóstico de certeza, en la medida de lo posible, para evitar tratamientos innecesarios en pacientes con deterioro del funcionalismo hepático y renal. Dado que el cultivo

Summary

The present study was performed to evaluate the effect of temperature and time of storage in the total leucocyte and polymorphonuclear leucocyte count in the ascitic fluid.

An initial count was performed in 47 ascitic fluid samples and two aliquots were taken for storage, one of them at 4° C and the other at 20-25° C. The count was repeated at 24 and 48 hours.

16 fluids were classified as infected and 31 as non infected. A progressive drop in the count was observed in the two storage conditions, being higher in the fluids stored at 20-25° C. All the fluids stored at 4° C and classified initially as infected remained as infected after 24 and 48 hours. No statistically significant difference was observed between the variation of the haemocytometer chamber count and the variation observed after 24 hours storage at 4° C for the total leucocyte and the polymorphonuclear leucocyte count ($p = 0.854$ and $p = 0.073$ respectively; Wilcoxon test for paired samples). Significant difference was observed for the polymorphonuclear leucocyte count in the other storage conditions and periods ($p < 0.05$).

We conclude that if the ascitic fluid count can not be performed immediately it can be performed at 24 hours in fluids stored at 4° C. None of the other storage conditions and periods are suitable for storage.

bacteriológico del líquido presenta una importante demora (12 horas como mínimo) se requieren otros criterios más inmediatos para la confirmación de la misma e instauración de tratamiento antibiótico; entre estos criterios se encuentran el recuento total y diferencial de leucocitos (polimorfonucleares/mononucleares), concentración de albúmina y proteína, actividad de lactato deshidrogenasa, concentración de glucosa, actividad de α -amilasa, etc.

Está establecido que, entre las magnitudes mencionadas, el recuento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) ofrece la mejor eficacia diagnóstica, considerándose como punto de corte para el diagnóstico de infección del líquido ascítico en pa-

1 Servicio de Análisis Clínicos. 2 Servicio de Gastroenterología. Hospital del Bierzo. León

3 Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Narcea. Asturias

4 Subdirección Médica de Servicios Centrales. Hospital de León

Recibido: 6-10-01

Aceptado: 30-5-02

Abreviaturas no estandarizadas:

PMN: leucocitos polimorfonucleares

PBE: peritonitis bacteriana espontánea

cientes sintomáticos un recuento igual o superior a 250 PMN/ μ L (1). Un recuento igual o superior a 500/ μ L confirma la presencia de PBE incluso en pacientes asintomáticos; si el recuento de PMN se encuentra entre 250/ μ L y 500/ μ L en un paciente asintomático, la paracentesis debe repetirse a las 24-48 horas (2).

Como ya ha sido mencionado, la importancia del recuento celular en el líquido ascítico radica en la obtención de una información rápida y fiable para la instauración de tratamiento. No obstante, en ocasiones el análisis del líquido no puede ser llevado a cabo de inmediato e incluso ni siquiera el mismo día de su obtención (punción realizada fuera de horario de laboratorios que no dispongan de personal de guardia, envío a laboratorios alejados del lugar de la punción, comprobaciones a posteriori, etc.) pero incluso en casos de importante demora, el resultado del análisis es de gran interés para decidir si se mantiene o se suspende el tratamiento antibiótico. Así pues, el conocimiento de las condiciones adecuadas y del tiempo máximo de conservación del líquido ascítico es de capital importancia. Sin embargo, aunque se ha estimado una escasa supervivencia de los PMN a temperatura ambiente (3), hasta nuestro conocimiento no se ha llevado a cabo ningún trabajo sobre este problema en líquidos ascíticos, aunque sí se ha abordado en otros líquidos biológicos (4,5).

El objetivo del presente trabajo es investigar los efectos de la temperatura y el tiempo de almacenamiento del líquido ascítico sobre el recuento de leucocitos totales y PMN. Se valora la influencia de dichas condiciones sobre la posible variación de la información diagnóstica ofrecida por el recuento para la clasificación del líquido ascítico como infectado o no infectado.

Material y métodos

Se examinaron 47 líquidos ascíticos remitidos al laboratorio procedentes de otros tantos pacientes, todos ellos diagnosticados de cirrosis hepática de origen etílico. Treinta y seis pacientes eran varones y once mujeres; el intervalo de edad fue de 45 a 76 años. Todos ellos presentaban ascitis manifiesta clínicamente y el líquido ascítico se obtuvo para su examen ante la sospecha clínica de PBE u otro tipo de infección del líquido ascítico (fundamentalmente por la presencia de fiebre o dolor abdominal). No se requirió consentimiento específico de los pacientes ya que sólo se utilizó el material sobrante del análisis rutinario. Los líquidos fueron recogidos en recipientes estériles sin anticoagulante. Antes de ser incluidos en el estudio, tuvieron que cumplir las siguientes especificaciones: (a) recibidos en el laboratorio para su examen microscópico antes de transcurrida 1 hora tras la paracentesis; (b) ausencia de coágulos y de hematíes a la inspección visual; (c) volumen superior a 2 mL y concentración inicial de PMN superior a 10/ μ L. Tras el recuento inicial de leucocitos totales y de PMN en el líquido «fresco», se tomaron dos alícuotas de igual volumen para su almacenamiento, una de ellas a 4°C y otra a temperatura ambiente (20-25 °C); el recuento de leucocitos y de PMN se repitió a las 24 y 48 horas en muestras obtenidas de dichas alícuotas. El recuento de leucocitos se llevó a cabo por el mismo investigador de forma manual en cámara de Fuchs-Rosenthal y por duplicado. Para el recuento de PMN se centrifugaron los líquidos a 500 xg durante 10 minutos y se examinó el sedimento obtenido tras extensión en portaobjetos y tinción de Giemsa; la cifra absoluta de PMN se obtuvo multiplicando la fracción

de PMN observada en dicho examen por el número total de leucocitos.

Se investigó la evolución global de los diferentes grupos de condiciones y tiempos de almacenamiento en términos de mediana y percentiles 25 y 75 (Microsoft Excel ver. 5.0) y el posible cambio de alguno de los líquidos del grupo de los clasificados como infectados al de los clasificados como no infectados. Se aplicó la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas a los distintos grupos de condiciones y tiempos de almacenamiento. Asimismo, dado el elevado error del recuento en cámara (debido a que sigue una distribución de Poisson) se planteó como hipótesis nula la inexistencia de diferencia significativa entre el error estándar del recuento inicial y la variación observada en el recuento de los diferentes grupos de almacenamiento; en este caso también se utilizó la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas (programa STATISTICA para Windows ver. 5.0). $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

El recuento inicial de leucocitos osciló entre 65/ μ L y 9600/ μ L. El recuento de PMN osciló entre 12/ μ L y 8064/ μ L; la mediana fue de 95 PMN/ μ L, el percentil 25 de 27 PMN/ μ L y el percentil 75 de 420 PMN/ μ L. Tras el recuento inicial, 16 líquidos fueron clasificados como infectados y 31 como no infectados. El recuento de leucocitos y PMN sufrió un descenso progresivo durante las 48 horas de almacenamiento, que fue mayor para los líquidos almacenados a temperatura ambiente que para los líquidos conservados a 4 °C. La mediana del recuento de PMN en los líquidos almacenados 24 horas a 4 °C fue de 79/ μ L, lo que representa una disminución de 16,8% respecto al valor inicial; tras 48 horas a 4 °C la mediana fue de 60 PMN/ μ L, lo que supone un descenso de 36,8% respecto al valor inicial. En los líquidos conservados a temperatura ambiente las medianas observadas fueron de 58 PMN/ μ L a las 24 horas y de 42 PMN/ μ L a las 48 horas, lo que supone un descenso de 38,9% y 55,8% respectivamente (figura 1). Comportamientos similares se observaron en los percentiles 25 y 75 de la distribución de recuentos.

En el caso de los líquidos clasificados inicialmente como infectados y almacenados a 4 °C, ninguno de ellos sufrió un descenso de contaje suficiente como para cambiar de grupo diagnóstico a las 24 ni a las 48 horas de almacenamiento. Sin

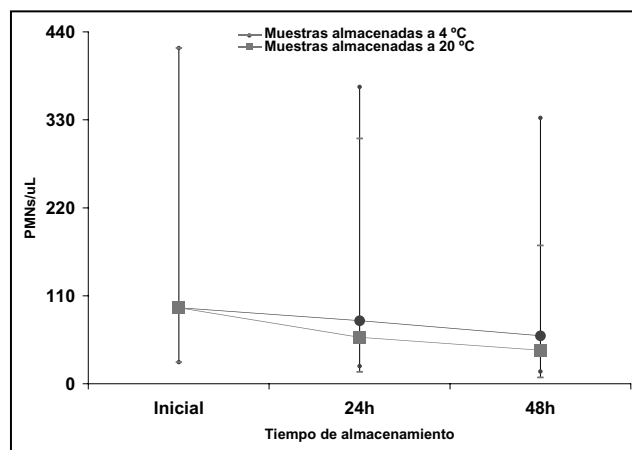


Figura 1. Recuento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en líquido ascítico, dependiendo de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Los valores se expresan como mediana y percentiles 25 y 75 para las alícuotas almacenadas a 4 °C (●) y a 20-25 °C (■).

embargo, dos de los líquidos almacenados a temperatura ambiente pasaron a tener un recuento inferior a 250 PMN/ μ L a las 24 horas de almacenamiento y dos más lo hicieron tras 48 horas de almacenamiento.

Tras aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas a los diferentes grupos de condiciones y tiempos de almacenamiento no se encontraron diferencias significativas entre el recuento inicial y el observado a las 24 y 48 horas a 4 °C, tanto para leucocitos totales como para PMN; sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en el grupo almacenado a 20-25 °C para ambos recuentos y tanto a las 24 como a las 48 horas ($p < 0,05$). Cuando se aplicó la prueba de Wilcoxon considerando como hipótesis nula la ausencia de diferencias entre el error estándar del recuento inicial y la variación observada en el recuento tras 24 y 48 horas a las diferentes temperaturas, los resultados obtenidos fueron los siguientes: no se observó diferencia significativa para los recuentos de leucocitos a las 24 ni a las 48 horas a 4 °C ($p = 0,854$ y $p = 0,071$ respectivamente) ni para el recuento de PMN a las 24 horas a 4 °C ($p = 0,073$); se observó diferencia significativa para el recuento de PMN a las 48 horas a 4 °C ($p = 0,043$); se apreció diferencia significativa para el recuento de leucocitos totales, tanto a las 24 como a las 48 horas, en los líquidos conservados a 20-25 °C ($p = 0,035$ y $p = 0,000066$ respectivamente) al igual que para el recuento de PMN en las mismas condiciones y tiempos ($p = 0,017$ y $p = 0,012$).

El deterioro citológico y la presencia de artefactos (lisis celular, núcleos picnóticos, células «fantasma») comenzaron a ser un problema para el recuento diferencial de los leucocitos teñidos con Giemsa a las 48 horas de almacenamiento. Este deterioro imposibilitó el recuento de PMN únicamente en uno de los líquidos clasificado como no infectado tras 48 horas, tanto a 4 °C como a temperatura ambiente; sin embargo, exigió un esfuerzo y tiempo adicionales por parte del examinador e introdujo cierta incertidumbre en el recuento diferencial de cuatro líquidos tras 48 horas a temperatura ambiente y de un líquido tras 48 horas a 4 °C. En dos de los líquidos almacenados a 4 °C se observó aglutinación de algunos leucocitos tanto a las 24 como a las 48 horas, pero en ningún caso este hecho impidió un recuento adecuado de los mismos.

Discusión

Teniendo en cuenta que el recuento celular en cámara sigue una distribución de Poisson (6) el coeficiente de variación (CV) viene dado por la fórmula $CV = 100 / \sqrt{n}$ células contadas. Suponiendo un recuento de 250 PMN/ μ L, la variabilidad esperada en el mismo es de ± 16 células y, por tanto, sería necesario un conteo de 282 PMN/ μ L (media + 2 s) para considerar infectado un líquido ascítico con una seguridad del 95%. Además, dicho recuento también presenta una variabilidad añadida debido a inexactitudes en la cuadrícula y en la profundidad de la cámara, cubreobjetos no perfectamente planos y mal posicionamiento del cubreobjetos (7). A todo ello hay que añadir la subjetividad inherente a cualquier observación microscópica y los errores de dilución de la muestra cuando ésta sea necesaria. Recientemente se han realizado estudios (8,9) sobre la utilidad de sistemas automáticos de conteo celular para el recuento en líquidos biológicos, pero dichos estudios han sido realizados únicamente en líquido cefalorraquídeo y sus resultados no son totalmente concluyentes; por tanto,

el recuento microscópico permanece como el único método válido en la actualidad para el recuento en líquido ascítico, a pesar de su gran variabilidad. Esta variabilidad y, como consecuencia, la relativa falta de fiabilidad de los recuentos en cámara debe ser tenida siempre presente a la hora de interpretar los resultados del recuento celular de un líquido. De este modo, si dicho recuento es cercano al punto de corte elegido para la clasificación del paciente como portador o no de infección del líquido ascítico, los hallazgos clínicos deben ser tenidos en cuenta con mayor escurpulosidad que en casos de recuentos celulares más alejados de dicho punto de corte. Obviamente, esta variabilidad puede influir tanto en sentido de descenso como de incremento del número de células contadas; debido a ello, en algunos casos de nuestro estudio se obtuvo un recuento de PMN más elevado tras el almacenamiento que en el examen inicial. No obstante, de forma global, hemos observado una clara tendencia al descenso progresivo del recuento de leucocitos y PMN a medida que aumentan el tiempo y la temperatura de almacenamiento. Sin embargo, dicho descenso no fue especialmente relevante desde el punto de vista clínico en el caso de los líquidos almacenados 24 horas a 4 °C (16,8% para el recuento de PMN). Tampoco se observó diferencia significativa en estas condiciones entre el recuento inicial y el de las 24 horas, ni entre la variabilidad del propio recuento en cámara y la obtenida tras el almacenamiento, tanto para PMN como para leucocitos totales; por tanto, consideramos que el recuento leucocitario de los líquidos ascíticos puede retrasarse 24 horas si éstos son conservados a 4 °C. Tras 48 horas a 4 °C el descenso observado en la mediana de los recuentos fue mucho mayor (36,8% para PMN) y, aunque no se apreció diferencia significativa entre el recuento inicial y el obtenido tras este periodo para leucocitos totales y PMN ni entre la variabilidad del recuento en cámara y el de leucocitos totales tras almacenamiento, sí se obtuvo dicha diferencia para el recuento de PMN; así pues, consideramos que el recuento de un líquido conservado 48 horas a 4 °C no es, en principio, recomendable. Las diferencias observadas en todos los casos para los recuentos tras almacenamiento a 20-25 °C hacen totalmente desaconsejable dicha temperatura para la conservación de líquidos ascíticos.

Aunque en nuestro estudio ninguno de los líquidos clasificados inicialmente como infectados cambió al grupo de los no infectados tras 24 horas a 4 °C, de acuerdo con los datos mencionados este hecho sería esperable en casos de recuentos iniciales muy cercanos al punto de corte.

No hemos valorado la posible influencia de las diferentes magnitudes bioquímicas (concentración de albúmina, actividad de lactato deshidrogenasa, etc.) sobre la evolución del recuento leucocitario; la valoración de estos factores y el estudio de un mayor número de muestras pueden ser objeto de futuros trabajos que permitan aportar nuevos datos sobre el tema.

Concluimos que los líquidos ascíticos que no puedan ser analizados inmediatamente tras la paracentesis deben ser refrigerados a 4 °C para su conservación. En estas condiciones se aprecia un descenso progresivo en el recuento de leucocitos y PMN, pero dicho recuento puede demorarse 24 horas sin que se observen diferencias significativas respecto al recuento inicial. En cualquier caso, debido al elevado CV del recuento celular en cámara y a la tendencia a la desaparición de los PMN con el tiempo, el resultado de un recuento cercano al límite de decisión diagnóstica debe ser interpretado con cautela en los líquidos examinados de inmediato y especialmente en los al-

macenados 24 horas a 4 °C. Ninguna otra condición o periodo de almacenamiento son aconsejables para un adecuado recuento leucocitario en líquido ascítico.

Correspondencia:
Luis García Menéndez
C/ Monasterio de Carracedo 2, 6º B
24400 Ponferrada (León)
e-mail: lgarcia@hbrz.insalud.es

Bibliografía

1. Runyon BA. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. En: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger M, eds. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 6th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998: 1310-33
2. Gilbert KA, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis: an update. Mayo Clin Proc 1995; 70: 365-70
3. Runyon BA. Diagnosis of bacterial infections in the setting of liver disease. En: Arroyo V, Bosch J, Rodés J, eds. Treatments in Hepatology. Barcelona: Masson S.A.; 1995: 93-9
4. Chou G, Schmidley JW. Lysis of erythrocytes and leukocytes in traumatic lumbar puncture. Arch Neurol 1984; 41: 1084
5. Jones STM, Denton J, Holt PJL, Freemont AJ. Refrigeration preserves synovial fluid cytology. Ann Rheum Dis 1993; 52: 384
6. Kjeldsberg CR, Krieg AF. Cerebrospinal fluid and other body fluids. En: Henry JB, ed. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 17th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1984: 459-92
7. Gadeholt H. Counting of cells in urine. The variability of haemocytometer counts. Acta Med Scand 1968; 183: 9-16
8. Ziebig R, Lun A, Sinha P. Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with the automated hematology analyzer Cell Dyn 3500 and the urine flow cytometer VF-100. Clin Chem 2000; 46: 242-7
9. Van Acker JT, Delanghe JR, Langlois MR, Taes YE, De Buyzere ML, Verstraete AG. Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid. Clin Chem 2001; 47: 556-60