

GUIA DE PROCEDIMIENTOS LAVADO BRONCOALVEOLAR

Martín Juan, J.

Servicio de Respiratorio, Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

INTRODUCCION

La técnica de lavado broncoalveolar (LBA), descrita inicialmente por Reynolds y Newball en 1974⁽¹⁾, fue concebida como procedimiento para analizar las células inmunes e inflamatorias del tracto respiratorio inferior tanto del pulmón⁽²⁾ normal como de varios tipos de patología intersticial.

Desde su descripción, su aplicabilidad ha ido aumentando progresivamente como técnica esencial en el aislamiento de patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos⁽³⁾. Además, en los últimos años se tiende a incluir esta técnica entre las tradicionales en el diagnóstico y valoración de la patología intersticial difusa^(4,6).

La buena correlación entre el tipo de células inmunes e inflamatorias obtenidas mediante el LBA y las observadas en muestras de biopsia pulmonar abierta, la buena tolerancia del procedimiento y la relativa ausencia de complicaciones importantes son factores que han contribuido a la expansión de su utilización.

A pesar de ello, la utilidad de esta técnica sigue siendo controvertida. Es asumido el valor diagnóstico de los hallazgos obtenidos en procesos como neumonía eosinófila crónica, histiocitosis X, proteinosis alveolar, neoplasias o síndrome de hemorragia alveolar difusa. En el resto de patología intersticial, puede aportar una información complementaria a los datos obtenidos por otras técnicas que permita estrechar las posibilidades diagnósticas u orientar en la solicitud de otros estudios complementarios⁽⁶⁾. En estos últimos procesos, la rentabilidad diagnóstica es muy variable según la patología estudiada. Así, su sensibilidad y especificidad es alta en patología granulomatosa (sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad y tuberculosis) y menor en patología fibrótica (de origen idiopático o la asociada a conectivopatías).

El valor de esta técnica para predecir pronóstico o respuesta al tratamiento está aún por determinar.

TECNICA DE REALIZACION

La indicación de realización del LBA en pacientes inmunodeprimidos para aislamiento de patógenos oportunistas está firmemente establecida. En estas circunstancias tan sólo es necesario realizar la técnica de acuerdo con un protocolo previamente establecido y el procesamiento adecuado de las muestras desde su obtención hasta su estudio en el laboratorio⁽⁷⁾.

En pacientes no inmunodeprimidos la decisión de efectuar un LBA para el estudio de la patología intersticial difusa, debe ser apoyada por una sospecha clínica razonable, unos datos radiológicos y un estudio funcional completo. Es fundamental para la interpretación de los hallazgos obtenidos, la historia acumulada de tabaquismo, el tipo de exposición laboral o ambiental y los tratamientos previos realizados.

En los pacientes que han presentado agudización de sus síntomas por infección bronquial intercurrente se debe diferir la realización de esta técnica ya que la inflamación de vía aérea puede alterar los recuentos celulares en la muestra alveolar.

La realización del LBA es sencilla y alarga unos pocos minutos la duración de la broncofibroscopia (BF). Si se precisa la toma de biopsias, éstas deben ser realizadas después del LBA.

La técnica no está definitivamente estandarizada lo cual dificulta la comparación de resultados entre los distintos autores. En esencia, consiste en la instilación a través del broncofibroscopio de un volumen determinado de suero fisiológico (en general entre 120 y 200 ml) a nivel de un segmento o subsegmento pulmonar (si es posible, debe utilizarse el lóbulo medio o llingula por ser segmentos declives en posición de decúbito). Parece razonable optar por segmentos con mayor afectación según el estudio radiológico simple o el de TAC torácico. El líquido para el lavado se instila en alícuotas de 20 a 50 ml con una jeringa. Cada instilación se sigue inmediatamente de una aspiración manual mediante la propia jeringa o bien con aspiración mecánica suave (con una presión de 5 cm. de agua), modificable en cada enfermo para conseguir la máxima cantidad de fluido instilado sin que colapse excesivamente la vía aérea y provoque su fusi3n hemorrágica submucosa.

El líquido recuperado (alrededor de un 40-50% del volumen instilado) suele ser traslúcido u opalescente dependiendo de la cantidad de material celular y no celular en suspensión. En los casos de hemorragia alveolar difusa, es típico el aspecto sonrosado o marronáceo, más intenso en las últimas alícuotas recuperadas. Distintos factores tales como el hábito en la realización de la técnica, grado de tolerancia, deterioro funcional previo y tipo de patología subyacente posiblemente determinen en mayor o menor grado el porcentaje de fluido recuperado.

La primera alícuota obtenida se considera representativa de la celularidad de vía aérea (muestra bronquial) y debe separarse del resto de alícuotas (muestra alveolar). El fluido debe verterse en frascos de plástico o vidrio siliconado para retardar la adherencia de las células a la pared y ha de ser mantenido a 4° C hasta su estudio, el cual no debe diferirse más de dos horas.

Si se requiere el transporte de las muestras a otro centro y por tanto se va a demorar su estudio, es útil resuspender la muestra obtenida en tubos de 50 ml con solución buffer salina sin iones Ca²⁺ ni Mg²⁺ (PBS o solución de Hanks, pH 7.20) y enviar en nevera con hielo.

Las variaciones en la técnica de obtención de muestras radican fundamentalmente en el volumen total instilado, que depende de la tolerancia del paciente y de la diversidad de estudios que se pretenda realizar. No obstante, una vez marcados los objetivos, debemos emplear un volumen lo más homogéneo posible en todos los pacientes.

PROCESAMIENTO Y ESTUDIO DE MUESTRAS

La muestra obtenida puede ser dividida para los distintos estudios requeridos según contexto clínico: estudio de microorganismos, partículas minerales, estudio de microscopía electrónica y sustancias solubles. El análisis de estas últimas es complejo debido a la dificultad para conocer el grado de dilución en cada paciente.

Para el estudio de la celularidad, es fundamental ajustarse estrictamente a un protocolo previamente establecido, ya que mínimas variaciones en el método pueden modificar ampliamente los resultados.

1. Separación de las células del sobrenadante.

Se realiza mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se separa y se alícuota en pequeñas cantidades a -70° C para posteriores estudios. El botón celular queda compacto en el fondo y se agita con vortex. Se resuspenden las células en 30-50 ml de PBS y se realiza una nueva centrifugación a la misma velocidad.

2. Contaje de células y distribución celular porcentual.

El contaje de células se realiza mediante una cámara de contaje (p.e. cámara de Neubauer o de Fueh-Rosenthal). Para ello se resuspenden las células en 1 ml de PBS o solución de Hanks; Se mezclan 5 ul de esta suspensión con 45 ul de Azul Trypan (tinción de exclusión para determinar simultáneamente viabilidad celular).

El número total de células es muy variable incluso entre individuos sanos incluidos en los grupos control de fumadores y no fumadores. Posiblemente está determinado por varios factores, algunos de ellos conocidos, como la

historia acumulada de tabaquismo y el volumen de fluido utilizado (a mayor volumen total instilado mayor número de células recuperadas).

En pacientes con patología intersticial también hay gran variabilidad en el número de células obtenidas. Además de los factores citados, influye la distinta evolución clínica entre pacientes, la falta de homogeneidad de afectación entre distintos territorios del pulmón y la variabilidad en el grado de repercusión funcional.

Es más útil para expresar el grado de "alveolitis" el cálculo de la concentración celular (nº de células / ml de fluido recuperado).

El nº total de células en individuos no fumadores oscila entre 10 x 1000000 y 20x 1000000 . En fumadores, esta cantidad puede ser entre tres y cuatro veces superior. Numerosos centros han publicado cifras de celularidad total y recuentos celulares diferenciales en sujetos normales. Los valores corresponden, salvo escasos estudio⁽⁸⁻⁹⁾, a un pequeño número de sujetos y los criterios de selección no están claramente definidos o varían considerablemente.

A pesar de la variabilidad de los resultados referidos por los distintos autores está aceptado que la celularidad presente en el fluido de LBA en sujetos normales consiste en su mayor parte de macrófagos (MAC) 80-95%, y en menor porcentaje linfocitos (LINF) <15%, y polinucleares neutrófilos (NEUTR) 2-5%. Los eosinófilos, basófilos y células plasmáticas, en general, no son observados o lo son en un porcentaje < 1%⁽⁸⁻⁹⁾.

El hábito tabáquico no sólo incrementa la celularidad total y concentración celular; además, modifica la distribución celular con descenso del porcentaje de LINF e incremento porcentual de neutrófilos.

La adecuada interpretación de los resultados del LBA depende de la apropiada identificación celular. Los dos métodos normalmente utilizados son la citocentrifugación con tinción de las muestras con May-Grunwald-Giemsa o Papanicolau o bien el empleo de filtros Millipore y tinción con Papanicolau o hematoxilina eosina. Ambas técnicas tienen ventajas e inconvenientes. Se ha comprobado una aparente pérdida de LINF con el primer método, aunque en grado muy variable entre pacientes. Con el segundo método, aunque es más laborioso, se obtiene buen detalle celular, no obstante se ha demostrado una menor estimación en el porcentaje de neutrófilos. En definitiva, los resultados obtenidos han de ser interpretados teniendo en cuenta las limitaciones de cada método empleado.

El estudio de distribución celular porcentual fue el primer parámetro utilizado para discriminar entre aquellas neumopatías de tipo granulomatoso (sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, beriliosis, tuberculosis) y las neumopatías fibróticas (fibrosis pulmonar idiopática y asociada a conectivopatías, neumopatías por fármacos, silicosis, asbestosis o bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa (BONO). En el primer grupo se observa generalmente una "alveolitis" linfocitaria (>15% de LINF) mientras que en el segundo existe una "alveolitis" neutrofilica (incremento porcentual de NEUTR aislados o bien con aumento de LINF o eosinófilos).

El estudio de morfología y distribución celular porcentual es también esencial para poder distinguir las muestras útiles para estudio de las no representativas de pulmón profundo⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Estas últimas, en general, se caracterizan por un escaso número de MAC o en porcentaje menor que el de células epiteliales ciliadas bronquiales, presencia de conglomerados de exudado mucopurulento con acúmulo de gran cantidad de NEUTR o un número excesivo de hematíes junto a alguno/s de los anteriores hallazgos.

3.- Estudio de Inmunofenotipo celular

La tecnología de hibridomas para obtención de anticuerpos monoclonales (AcMo) reconocedores de antígenos (Ags) en superficie junto con las técnicas de inmunofluorescencia (InmFI) e inmunocitoquímica (InmCitq) están revolucionando los estudios sobre actividad funcional de las poblaciones celulares de línea linfocítica y monocito/macrofágica en el fluido de LBA en las distintas neumopatías intersticiales y el estudio de la participación pulmonar en la infección por el VIH⁽¹²⁻¹³⁾.

El estudio de muestras mediante InmFI puede realizarse mediante microscopio de fluorescencia⁽¹⁵⁾ o bien de forma automatizada mediante citometría de flujo.

Las ventajas de las técnicas de InmFI, sobre todo la citometría de flujo^(9,14,16,18) son la mayor posibilidad del estudio inmediato y la sencillez de realización por personal experimentado. Sus desventajas son la imposibilidad de preservar durante mucho tiempo las muestras.

Las técnicas de InmCitq más utilizadas peroxidasa/ antiperoxidasa⁽¹⁹⁾ o fósfatasa alcalina/antifósfatasa alcalina⁽²⁰⁾ son más laboriosas. Su estudio se realiza con microscopio óptico. Sus ventajas más importantes son la necesidad de un menor número de células y sobre todo, la posibilidad de preservación tras tinción y el estudio diferido de muestras criopreservadas.

La aplicación de una u otra técnica depende de la disponibilidad técnica en cada medio y la finalidad del estudio.

El examen inmúnológico de las muestras de LBA en general es complejo por varios motivos, por ejemplo:

- Gran diversidad de Ags de diferenciación leucocitaria. Son 78 los CD o clusters de diferenciación oficialmente reconocidos (desde CD1 a CDw78). Muchos de estos Ags no son específicos de ningún linaje celular. En el caso de algunos AcMo es desconocida la significación funcional y/ o especificidad de reacción con un determinado CD, lo cual dificulta la interpretación de los resultados obtenidos.

- Falta una estandarización en lo referente a panel de AcMo utilizables, la técnica de estudio de reacción Ag/ AcMo (InmFI vs InmCitq) o los controles de calidad aplicables. En sujetos normales hay variabilidad en los datos referidos debido a que los grupos estudiados son diferentes en número y la técnica empleada ha sido distinta (TABLA I). En sujetos fumadores ha sido descrito un descenso en la proporción de LINFC CD4+(helper/ inductores e incremento en la de LINFC CD8+ (supresores/ citotóxicos) con reducción del índice CD4+/CD8+. Es posible que el hábito tabáquico altere la inmunoregulación a nivel local pulmonar y modifique el curso subclínico de algunas enfermedades intersticiales. Este efecto debe tenerse en cuenta a la hora de valorar la celularidad en el LBA.

TABLA I
FENOTIPO INMUNE DE LINFOCITOS EN EL LBA DE SUJETOS SANOS

Autores	Ref.	Año	Método	n	LINFC	LT tot.(%)			CD4/CD8	LB(%)
						CD3+	CD4+	CD8+		
ESTUDIOS EN NO FUMADORES										
Davidson	(14)	1985	CitFlu	10	13.7	49.0	58.0	34.0	1.9	NR
Semenzato	(15)	1986	MFI-IFI	12	7.5	67.3	43.2	22.1	2.0	NR
Yamada	(16)	1986	CitFlu	23	13.8	63.0	45.4	25.3	1.8	5.3
Costabel	(17)	1986	PAP	11	7.0	72.1	54.1	33.0	1.9	<1
NHLBI	(9)	1990	CitFlu	30	11.8	70.2	44.4	20.7	2.6	3.2
Ancochea	(18)	1993	CitFlu	8	9.2	75.1	49.8	26.2	1.9	5.3
ESTUDIOS EN FUMADORES										
Costabel	(17)	1986	PAP	12	3.0	75.4	33.0	50.0	0.9	<1
NHLBI	(9)	1990	CitFlu	29	5.2	69.2	32.2	29.2	1.6	6
Ancochea	(18)	1993	CitFlu	8	2.6	67.6	31.3	39.2	0.9	5.2

Abreviaturas empleadas: Ref.(referencia bibliográfica); n (nº de pacientes); LINFC (porcentaje de linfocitos con tinción habitual); NR (dato no referido); CitFlu (Citometría de flujo); MFI-IFI (Microscopio de fluorescencia y técnica de inmunofluorescencia indirecta); PAP (técnica de peroxidasa/antiperoxidasa) NHLBI (estudio promovido por el NHLBI División de Enfermedades Pulmonares).

En neumopatías difusas, es admitida ya la utilidad de los distintos modelos de respuesta inmune según el disbalance de subpoblaciones linfocitarias observado^(4,6,12):

- Expansión de subpoblación CD4+ con normalidad en la CD8+ como se aprecia en sarcoidosis, beriliosis, asbestosis, artritis reumatoide; el cociente CD4/CD8 está incrementado con respecto a la normalidad.

- Expansión de la subpoblación CD8 + con normalidad en la CD4+ como ocurre en neumonitis por hipersensibilidad, silicosis, neumonitis por fármacos o asociada a conectivopatías, en el rechazo de injerto y la BONO; el cociente CD4/CD8 está reducido.

- Expansión de la subpoblación CD8+ con reducción progresiva en la CD4+, hallazgo común en distintos estadios de la infección por VIH+; el índice CD4/CD8 está muy reducido.

Tanto los patrones de distribución celular porcentual como de fenotipo inmune no son excluyentes ya que tanto el reclutamiento de células inmunes e inflamatorias en el pulmón como su replicación local son procesos dinámicos y por ello modificables en corto espacio de tiempo a lo largo del curso clínico de la enfermedad.

La población de macrófagos alveolares es clave en el inicio y mantenimiento de la respuesta inmune. Aún siendo la más expandida en la mayor parte de los procesos intersticiales no ha sido valorada funcionalmente hasta los últimos años en que han sido descritos múltiples ligandos en superficie con funciones tan diversas como presentación de Ag al linfocito T, quimiotaxis, adhesión, fagocitosis, receptor para VIH, entre otros. La modulación en la expresión de estos receptores en las distintas enfermedades intersticiales es otra de las muy diversas vías de estudio en la actualidad.

En la TABLA II se resumen los antígenos de serie linfoide y línea monocito-macrófaga más frecuentemente valorados en los estudios de LBA, su distribución y significación biológica.

TABLA II
ANTIGENOS DE DIFERENCIACION LEUCOCITARIA VALORADOS
CON MAS FRECUENCIA EN LOS ESTUDIOS DE LBA

CD	Anticuerpo	Reactividad	Co-expresión	Antígeno y función
CD1a	OKT6, Leu-6	Timocitos inmaduros Céls. de Langerhans		Subunidad β-2 microglobulina
CD3	OKT3, Leu-4	Timocitos y linfocitos T		Receptor de células T (TCR)
CD4	OKT4, Leu-3	Células T helper-inductoras	Monocitos y macrófagos	Receptor Clase II del MHC/ Receptor para el VIH
CD8	OKT8, Leu-2	Células T supresoras-citotóxicas	Subpobl. NK	Receptor Clase I del MHC
CD11a		Leucocitos		Cadena α del Ag LFA-1. ICAM-1(CD54) es su ligando (molécula de adhesión)
CD11b	OKM1, Leu-15 Mol	Más del 90% de monocitos y neutrófilos	Subpobl. NK	Cadena α-2 de Mac-1 (receptor C3bi molécula adhesión)
CD11c		Monocitos, granulocitos y macr. tisulares	Células T y B	Cadena α-3 del complejo LFA1 (p150/95,C4R/molécula adhesión)
CD14	My4, Leu-M3 Mo2, UCHM1	Serie monocito/macrófago	PMN (débil)	Receptor para LPS (implicado en liberación de interleuquinas)
CD16		Células NK	Granulocitos/macrófagos	Receptor Fc de baja afinidad para IgG(FcRIII)
CD45		Subpoblaciones de células T, B y macrófagos		Antígeno común leucocitario (control positivo)
CD20	Leu-16	Todas las células B		
CD25	IL-2 recep.	Células T activadas, monocitos, macrófagos	Células B y NK	Receptor para la IL-2
CD57	Leu-7	Células NK (Linfocitos granulares)	Subp. céls T	
CD71	OKT9	Células T activadas Células en estadio de proliferación		Receptor transferrina
CD69		Células T activadas		Ag inicial de activación
HLA-DR		Monocitos, células B y células T activadas.		Ag Clase II del MHC

BIBLIOGRAFÍA

1. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84: 559-573.
2. Daniele RP, Altose MD, Rowland DT Jr. Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal human lungs. *J Clin Invest* 1975; 56: 986-995.
3. Stover DE, Zaman MB, Hajdu SI, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Intern Med* 1984;101: 1-7.
4. Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, Rossman MD. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 1985; 102: 93-108.
5. Turner-Warwick M, Haslam PL. Clinical applications of bronchoalveolar lavage. *Clin Chest Med* 1987; 8:15-26.
6. Reynolds H.Y. Bronchoalveolar lavage-state of the art. *Am Rev Respir Dis* 1987;135: 250-263.
7. Kahn FW, Jones M. Analysis of bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients with a protocol applicable in the microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1150-1155.
8. Etensohn DB, Jankowski MJ, Duncan PG, Lalor PA. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. *Chest* 1988; 94: 275-280.
9. The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparisons groups. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141 (Suppl.): 169-202.
10. Chamberlain DW, Braude AC, Rebeck AS. A critical evaluation of bronchoalveolar lavage. Criteria for identifying unsatisfactory specimens. *Acta Cytol* 1987; 31: 599-605.
11. Rennard SI, Ghafouri M, Thompson AB, et al. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 208-217.
12. Agostini C, Chilosi M, Zambello R, Trentin L, Semenzato G. Pulmonary immune cells in health and disease: lymphocytes. *Eur Respir J* 1993; 6: 1378-1401.
13. Agostini C, Trentin L, Zambello R, Semenzato G. HIV-1 and the lung. Infectivity, pathogenic mechanisms, and cellular immune responses taking place in the lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1038-1049.
14. Davidson BL, Faust J, Pessano S, Daniele RP, Rovera G. Differentiation and activation phenotypes of lung T lymphocytes differ from those of circulating T lymphocytes. *J Clin Invest* 1985; 76: 60-65.
15. Semenzato G, Agostini C, Zambello R, et al. Lung T cells in hypersensitivity:pneumonitis:phenotypic and functional analysis. *J Immunol* 1986; 137:1164-1172.
16. Yamada M, Tamura N, Shirai T, Kira S. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets in the bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of healthy volunteers. *Scand J Immunol* 1986; 24: 559- 565.
17. Costabel U, Bross K.J, Reuler CH. Alterations in immunoregulatory T-cells subsets in cigarette smokers: a phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 90: 39-44.
18. Ancochea J, Gonzalez A, Sánchez M.J, Aspa J, López-Botet M. Expression of lymphocyte activation surface antigens in bronchoalveolar lavage and peripheral blood cells from young healthy subjects. *Chest* 1993; 104: 32-37.
19. Costabel U, Bross K. J, Matthys H. The immunoperoxidase slide assay. A new method for demonstration of surface antigens on bronchoalveolar lavage cells. *Bull Eur Physiopathol Resper* 1985; 21: 381-387.
20. Xaubet A, Agusti C, Picado C, et al. Demonstration of surface antigens on bronchoalveolar lavage cells using the immunoalkaline phosphatase method. *Respiration* 1989; 56: 43-47.