

Estudio de calidad y selección de muestras de lavado broncoalveolar (LBA) en neumopatías difusas

J. Martín Juan, F. Valenzuela Mateos, G. Soto Campos, A. Segado Soriano, F. Rodríguez Panadero y J. Castillo Gómez

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

Uno de los requisitos esenciales en la técnica de LBA, cuando se utiliza con el fin concreto de estudiar la respuesta inmune o inflamatoria en patología intersticial pulmonar, es que las muestras obtenidas sean representativas del tracto respiratorio inferior. Por ello, la selección de muestras adecuadas es un paso obligado en el estudio de rutina.

Valorar la incidencia de muestras de LBA no idóneas para estudio citológico y determinar la relación entre parámetros relacionados con la técnica y patología subyacente con la calidad de especímenes.

Se incluyeron 161 pacientes: 72 infectados por el VIH con infiltrados pulmonares difusos, 34 fibrosis pulmonar idiopática (FPI), 10 sarcoidosis, 10 neumonitis por hipersensibilidad, 19 con neumopatía intersticial asociada a enfermedades del colágeno, dos con eosinofilia pulmonar y 14 pacientes seleccionados como grupo control.

Para el estudio de calidad se realizó tinción de muestras de LBA con técnica de Wright-Giemsa modificada y se emplearon los criterios de selección descritos por Chamberlain et al (1987). Resultaron no útiles para estudio el 53% de muestras en pacientes infectados por el VIH, el 35% en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y el 21% en neumopatía intersticial asociada a conectivopatías. En el resto, todas las muestras fueron útiles para estudio. La intolerancia del LBA con descenso del porcentaje de fluido recuperado se asoció significativamente con la calidad de muestras sobre todo en el grupo con FPI. Los hallazgos citológicos que invalidaron las muestras fueron diferentes entre grupos. Como dato común, las muestras inadecuadas mostraron una baja concentración celular. Por otro lado, la evidencia o no de infección asociada en pacientes infectados por el VIH, al contrario que en otras neumopatías, no parece ser un factor que determine por sí mismo la calidad de muestras.

Es previsible la obtención de un porcentaje importante de muestras de LBA no idóneas para estudio, sobre todo en neumopatía difusa asociada a infección VIH, FPI y neumopatía intersticial asociada a conectivopatías. Por otra parte, la tolerancia de la técnica, entre otros factores, influye en la calidad del espécimen y, por tanto, ha de tenerse en cuenta en la valoración de los hallazgos citológicos.

Falta por homogeneizar la aplicación de criterios de calidad entre los distintos grupos de trabajo y determinar si la exclusión de muestras no útiles repercute en la composición final de los grupos de estudio.

Palabras clave: Lavado broncoalveolar. Calidad de muestras. Enfermedad pulmonar intersticial.

Arch Bronconeumol 1996; 32: 332-340

Quality study and screening of bronchoalveolar lavage samples

Bronchoalveolar lavage (BAL) samples used to study immune or inflammatory response in interstitial lung disease must be representative of the lower respiratory tract. Thus, the selection of suitable samples must be part of routine practice.

To assess the incidence of unsuitable BAL samples used for cytology and to determine the relation between parameters related to underlying disease and the quality of samples.

One hundred sixty-one patients were enrolled. Seventy-two were HIV positive and had diffuse pulmonary infiltrates, 34 had idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), 10 had sarcoidosis, 10 had hypersensitivity pneumonitis, 19 had interstitial lung disease and collagen diseases and 2 had pulmonary eosinophilia. Fourteen individuals formed the control group.

The quality study was carried out by staining the BAL samples following a modified Wright-Giemsa technique and evaluating the samples by the selection criteria described by Chamberlain and colleagues (1987).

We identified unsuitable samples from 53% of the HIV positive patients, from 35% of the IPF patients and from 21% of the interstitial lung disease patients with associated connective tissue disease. In the other groups, all samples were suitable for analysis. Intolerance of BAL with decreasing percentage of fluid recovered was significantly associated with sample quality, particularly in the IPF group. The cytology results that invalidated the samples differed by group. In all groups, unsuitable specimens had low cell counts. The finding or not of evidence of associated infection

Correspondencia: Dr. J. Martín Juan.
Virgen de Valvanera, 19, Edif. Madrid 12.º A.
41018 Sevilla.

Recibido: 14-11-94; aceptado para su publicación: 13-2-96.



in HIV-infected patients, on the other hand, did not appear to determine sample quality in and of itself, although it did in samples related to other entities.

We can predict that a high rate of unsuitable BAL samples will come mainly from patients with diffuse lung disease associated to HIV infection, IPF and interstitial lung disease with associated connective tissue disease. Tolerance to the technique influences quality of the specimen obtained and, therefore, should be taken into account in interpreting the findings of cytology.

The criteria applied by the various teams using BAL should be unified, and it should be determined whether the exclusion of inappropriate samples affects the final composition of study groups.

Key words: *Bronchoalveolar lavage. Quality samples. Interstitial lung disease.*

Introducción

Desde la descripción de la técnica del lavado broncoalveolar (LBA) por Reynolds y Newball en 1974¹, ésta ha sido muy utilizada en el aislamiento de patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos y en la investigación de los mecanismos patogénicos que operan en el tracto respiratorio inferior (TRI) en distintos tipos de patología intersticial. En estos casos, los hallazgos pueden tener utilidad diagnóstica, estrechar el diagnóstico diferencial o bien orientar en la solicitud de otros estudios.

La aplicación de esta técnica en cualquiera de estas circunstancias requiere la utilización de un protocolo de trabajo estricto. Pero, además, es requisito básico que el espécimen de LBA obtenido sea representativo del TRI con mínimos componentes de vía aérea proximal. Aunque en la práctica habitual esta condición teórica es difícil de valorar individualmente, sí es posible establecer criterios de selección que faciliten la identificación de muestras no representativas. Sin embargo, no existe unanimidad entre los distintos autores en cuanto a la necesidad de esta selección ni en la forma de realizarla^{2,3}.

Lo factores que determinan la calidad de muestras obtenidas son diversos y probablemente se asocian tanto con la realización de la técnica como con la patología subyacente.

El objetivo de este estudio ha sido valorar la incidencia de muestras de LBA no idóneas para estudio en las distintas neumopatías difusas y determinar su correlación con los parámetros asociados con la técnica (tolerancia y porcentaje del fluido recuperado), con el tipo de patología subyacente y grado de deterioro funcional.

Material y métodos

El estudio, de carácter prospectivo, fue realizado en el período comprendido entre enero de 1992 y septiembre de 1994 en el Servicio de Respiratorio del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Las muestras fueron procesadas y estudiadas en el laboratorio de la sección de endoscopia respiratoria.

Criterios de inclusión de pacientes

Los criterios de inclusión fueron la existencia de un patrón radiológico de predominio difuso y la ausencia de signos endoscópicos propios de inflamación bronquial aguda (enrojecimiento, edema y secreciones mucopurulentas). Estos criterios se aplicaron a todos los grupos estudiados.

Criterios de selección de muestras

De los pacientes incluidos inicialmente, fueron excluidas de antemano las muestras con aspecto serohemorrágico intenso o mucopurulento con excesivo moco en suspensión y/o escaso volumen recuperado (< 25%). En nuestra experiencia, volúmenes inferiores se asocian, entre otros factores, a dificultad en la técnica con traumatismo de mucosa bronquial y sufusión hemorrágica por la presión de succión. En estos casos se observa, por lo general, un aumento de células epiteliales bronquiales (CEB) y escasez de células macrófágicas. Aunque el aspecto de estas muestras excluidas no impide realizar estudios de rutina, el uso de éstas con fines diagnósticos o de investigación exige realizar varias hemolizaciones o incluso añadir a la muestra agentes mucolíticos. Por este motivo, para homogeneizar la aplicación de criterios de selección, hemos considerado estas muestras como inadecuadas por requerir un procesamiento especial.

Fueron incluidos definitivamente en el estudio 161 pacientes (tabla I). Del total, 72 estaban infectados por el VIH (ND-VIH). La sintomatología respiratoria y deterioro del intercambio gaseoso fueron muy variables. La expresión radiológica osciló entre tenue patrón intersticial y alveolointersticial muy manifiesto. Se excluyeron los casos con predominio de afectación segmentaria o lobar o evidencia clara de cavitación.

En 34 pacientes se estableció el diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y se basó en datos clínicos, radiológicos y funcionales en ausencia de otros hallazgos en la evolución orientativos de una enfermedad del tejido colágeno. La tomografía axial computarizada en todos los casos mostró, en distinto grado, un patrón de relleno alveolar, opacidades reticulares de predominio en zonas subpleurales y claro aplanamiento en estas mismas zonas en los casos más evolucionados. Tan sólo en 12 de los 34 pacientes fue posible la confirmación histológica mediante biopsia pulmonar abierta.

Fueron incluidos 10 casos con sarcoidosis y 10 con neumonitis por hipersensibilidad. El diagnóstico se basó en datos clínicos, radiológicos, funcionales, serológicos y en el estudio histológico.

En 19 se realizó LBA para valoración de neumopatía intersticial asociada a enfermedades del colágeno (NI-EC): ocho con esclerosis sistémica progresiva, ocho con lupus eritematoso sistémico (LES), uno con dermatomiositis, uno con artritis reumatoide y uno con síndrome de Sjögren.

En otros 2 casos el LBA se realizó por la existencia de infiltrados pulmonares cambiantes y eosinofilia en sangre: uno se diagnosticó de neumonía eosinófila crónica y otro de síndrome de Churg-Strauss.

Finalmente, fueron incluidos 14 como grupo control seleccionados entre los que acudían a realización de broncofibroscopia (BF) por otros motivos: hemoptisis, nódulos periféricos o estudio de patología de aspecto residual. Siete de ellos eran fumadores y el resto no fumadores. Se procuró realizar el LBA en situación de estabilidad clínica y en los casos de pacientes con hemoptisis, generalmente de muy pequeña cuantía, se efectuó varios días tras el episodio. En todos los sujetos los estudios citopatológico y microbiológico resultaron negativos.

Fueron también incluidos en el estudio los datos de función respiratoria disponibles al tiempo de realización del LBA.



TABLA I
Grupos incluidos en estudio y datos funcionales respiratorios

Diagnóstico	N.º	Edad	Fumador/ No fumador	FVC (%)	FEV1 (%)	FEV1/FVC (%) (%)
Neumopatía difusa asociada a infección por VIH	72	33 ± 10	50/22	ND	ND	ND
Fibrosis pulmonar idiopática	34	57 ± 15	18/16	70,5 ± 22	72,5 ± 20	90,3 ± 18
Sarcoidosis	10	42 ± 8	3/10	78,7 ± 22	75,8 ± 22	84,2 ± 6
Neumonitis por hipersensibilidad	10	43 ± 17	0/10	67,9 ± 17	66,3 ± 17	90,3 ± 18
Neumopatía intersticial asociada a enfermedades del colágeno	19					
Esclerodermia sistémica progresiva	8	50 ± 15	2/6	73,1 ± 17	66,2 ± 17	76,7 ± 8
Lupus eritematoso sistémico	8	40 ± 13	0/8	78,0 ± 18	78,0 ± 18	86,3 ± 4
Dermatomiositis	1	56	0/1	ND	ND	ND
Artritis reumatoide	1	48	0/1	122	111	91
Síndrome de Sjögren	1	44	0/1	40	35	87
Síndrome de Churg-Strauss	1	67	0/1	ND	ND	ND
Neumonía eosinofílica crónica	1	48	0/1	65	62	95
Grupo control	14	48 ± 16	7/7	85,2 ± 22	74,3 ± 27	72,8 ± 16

Todos los datos se muestran como media ± desviación estándar.
ND: datos de función respiratoria no disponibles al tiempo de realizar el lavado broncoalveolar.

Broncofibroscopia y lavado broncoalveolar

La BF se realizó según técnica habitual utilizando un broncofibroscopio tipo Olympus 1T20D u otro modelo similar. El LBA se hizo antes de cualquier otra técnica para evitar contaminación con sangre. El volumen empleado osciló entre 120 y 200 ml de suero fisiológico a temperatura ambiente instilado en 6 alícuotas de 20 ml o 4 de 50 ml. La recuperación de fluido se realizó mediante aspiración suave con conexión a fuente de vacío. En todos los casos se separó la primera fracción de fluido recuperado por ser más representativa de la vía aérea

proximal⁴. Las muestras se filtraron a través de una gasa estéril de 2 capas para evitar el moco y depositadas en tubos de 50 ml de plástico siliconado para retardar la adherencia de las células. El procesamiento de éstas, o bien se realizó inmediatamente o en un tiempo no superior a una hora. Una parte se destinó para estudios habituales según el contexto clínico.

Valoración del grado de tolerancia del lavado broncoalveolar

Se consideró como buena tolerancia la relativa ausencia de síntomas y la posibilidad de realizar la técnica sin dificultades. La mala tolerancia se definió por la presencia de disnea con caída de la saturación, tos intensa de difícil control con descolocación del BF o dificultad para la ejecución completa de la técnica.

Procesamiento de muestras

Tras anotar el volumen total y porcentaje de fluido recuperado (PR), se realizó una primera centrifugación a 2.000 rpm (400 g) durante 10 minutos para separar las células. El botón celular se resuspendió hasta el volumen inicial con solución *buffer* salina sin CA^{2+} ni Mg^{2+} (PBS, pH 7,20). Se realizó una nueva centrifugación a la misma velocidad. El pellet de célu-

TABLA II
Criterios empleados para evaluar la calidad de las muestras

1. Escasez de macrófagos alveolares, con > 10 por campo de alta resolución a < 25 en combinación con los criterios 2 o 3
2. Excesivo número de células epiteliales, sobre todo si supera el de macrófagos alveolares
3. Exudado mucopurulento de células polimorfonucleares
4. Excesiva contaminación de hematíes en combinación con al menos uno de los anteriores criterios
5. Cambios degenerativos y/o artefactos inducidos en el procesamiento que dificulten la identificación celular

Criterios basados en los de Chamberlain et al³.

TABLA III
Parámetros valorados en relación con la técnica

	Pacientes							
	ND-VIH	FPI	Sarc	NH	NI-EC	SChStr	NEC	Control
Número	72	34	10	10	19	1	1	14
BT	47 (65%)	22 (65%)	8 (80%)	8 (80%)	14 (74%)	1	1	11 (78%)
MT	25 (35%)	12 (35%)	2 (20%)	2 (20%)	5 (26%)	—	—	3 (22%)
PR grupo (%)	41,8 ± 10 ^a	46,1 ± 14	51,4 ± 10 ^a	49,2 ± 15	50,8 ± 13 ^a	48	50	50,2 ± 13 ^a
PR BT (%)	44,7 ± 9 ^b	50,2 ± 3 ^c	—	—	53,0 ± 12	—	—	—
PR MT (%)	37,8 ± 9 ^b	36,3 ± 2 ^c	—	—	45,8 ± 13	—	—	—

PR: porcentaje de fluido recuperado en cada grupo y en condiciones de buena y mala tolerancia; ND-VIH: neumopatía difusa asociada a infección por VIH; FPI: fibrosis pulmonar idiopática; Sarc: sarcoidosis; NH: neumonitis por hipersensibilidad; NI-EC: neumopatía intersticial asociada a enfermedades del colágeno; SChStr: síndrome de Churg-Strauss; NEC: neumonía eosinofílica crónica; Control: grupo control; BT: buena tolerancia; MT: mala tolerancia.

^aDiferencia significativa ($p < 0,05$) en PR entre pacientes VIH+ y los otros grupos señalados.

^bDiferencia significativa ($p < 0,01$) en PR entre pacientes VIH+ según tolerancia.

^cDiferencia significativa ($p < 0,01$) en PR entre pacientes con NII según tolerancia.

las se resuspendió nuevamente en 1 ml de PBS para el recuento de células totales, concentración celular y viabilidad con azul Trypan en cámara de Neubauer. Tras ello se añadió PBS hasta el volumen original, del cual se emplearon pequeñas alícuotas (200-400 µl) para obtener las preparaciones celulares (centrífugas Hettich D-7200; Tuttlinguen, Alemania).

Fueron secadas a temperatura ambiente durante 2 horas, teñidas con tinción de Wright-Giemsa modificada (Quick Panóptico®, QCA) y cubiertas con DePeX. Se realizó estudio de calidad y de distribución celular mediante identificación de 300-400 células a 400x (Olympus BH-2). Se utilizó el objetivo de 100x (1.000x total) en los casos de dificultad en la identificación celular. La selección final de muestras se realizó aplicando los criterios de calidad descritos por Chamberlain et al (1987)³ (tabla II).

Análisis estadístico

Las diferencias entre medias se valoraron mediante la prueba U de Mann-Whitney. La asociación entre variables cualitativas se valoró mediante el test de χ^2 o la prueba exacta de Fisher según el tamaño de la muestra en cada ocasión. El grado de correlación entre variables cuantitativas se determinó con el test de coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Relación entre tolerancia de la técnica y calidad de muestras

En los casos con ND-VIH, la técnica fue bien tolerada por el 65% de pacientes; el PR en este grupo fue superior que el obtenido con mala tolerancia ($44,7 \pm 9$ frente a $37,8 \pm 9$; $p < 0,01$) (tabla III). Del grupo con buena tolerancia fueron excluidos 13 (27%) por su aspecto sero-

hemorrágico o con excesivo moco en suspensión y siete (15%) por no cumplir criterios de calidad. Del grupo con mala tolerancia se excluyeron 13 muestras (52%) por su aspecto macroscópico y cinco (20%) según criterios citológicos. Se comprobó una asociación de la calidad de muestras con el grado de tolerancia ($p < 0,05$).

En el grupo con FPI, la técnica fue bien tolerada por el 65% de los pacientes y mal tolerada por el 35%. Se observó una diferencia significativa en el PR entre ambos subgrupos ($50,2 \pm 3$ frente a $36,3 \pm 2$; $p < 0,01$) (tabla III). El 35% (12/34) de muestras obtenidas en estos casos no fueron útiles para estudio de LBA según protocolo establecido. El PR en estos casos fue significativamente menor que el obtenido en muestras adecuadas (39 ± 3 frente al 50 ± 3 ; $p < 0,05$) (tabla IV). Se observó una asociación significativa de la calidad de muestras con el grado de tolerancia ($p < 0,05$).

En los casos con sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad, la técnica se toleró bien en el 80% de los casos en ambos grupos y todas las muestras fueron útiles para estudio.

Del grupo de pacientes con NI-EC, la técnica fue bien tolerada por el 74%. El PR fue mayor en estos casos que en los que mostraron mala tolerancia (53 ± 12 frente a $45,8 \pm 13$) aunque sin diferencia significativa (tabla III). Del total de muestras, 15 (79%) fueron adecuadas. El PR en éstas fue mayor que el obtenido en los casos con mala calidad ($53,7 \pm 12$ frente a 40 ± 12 ; $p < 0,05$) las cuales correspondían a pacientes con LES (tabla IV).

En los 2 casos con eosinofilia pulmonar, ambas muestras fueron aptas.

En el grupo control, la tolerancia del procedimiento fue buena en el 78% y el PR fue de $50 \pm 12\%$. Todas las muestras fueron idóneas para estudio.

TABLA IV
Parámetros valorados en relación con la calidad de las muestras

	Pacientes							
	ND-VIH	FPI	Sarc	NH	NI-EC	SChStr	NEC	Control
Número	72	34	10	10	19	1	1	14
Muestras adecuadas	47%	65%	100%	100%	79% ^f	100%	100%	100%
PR (%)								
Adecuadas	$43,9 \pm 12$	50 ± 3^b	$51,4 \pm 10$	$49,2 \pm 15$	$53,7 \pm 12^g$	48	50	$50,2 \pm 13$
No adecuadas	$39,1 \pm 9$	39 ± 3	–	–	$40,0 \pm 12^g$	–	–	–
Tabaquismo (%)								
Adecuadas	73%	27%	30%	–	–	–	–	56%
No adecuadas	68%	42%	–	–	–	–	–	–
Infección asociada	51 (70%) ^a	1 (3%) ^c	–	–	1 (5%) ^h	–	–	–
PaO ₂ basal								
Adecuadas	$71,7 \pm 18$	$66,4 \pm 11^d$	$76,1 \pm 14$	$87,5 \pm 11$	$82,8 \pm 13$	–	–	$76,2 \pm 13$
No adecuadas	77 ± 17	$80,0 \pm 11^d$	–	–	–	–	–	–
$\Delta AaPO_2$								
Adecuadas	$33,2 \pm 15$	$33,3 \pm 12^e$	$23,2 \pm 11$	$18,4 \pm 11$	$16,9 \pm 11$	–	–	$15,4 \pm 12$
No adecuadas	$27,8 \pm 15$	$19,0 \pm 11^e$	–	–	–	–	–	–

Abreviaturas como en la tabla III. PR (%): porcentaje de fluido recuperado obtenido según calidad de las muestras.

^aNo hay diferencias entre útiles y excluidos en cuanto a frecuencia de aislamiento de patógenos o de coinfecciones (véase texto).

^bDiferencia significativa ($p < 0,05$) en PR entre pacientes con FPI según la calidad de muestras.

^cAislamiento de *Staphylococcus pneumoniae* en muestras de lavado broncoalveolar y necropsia.

^dDiferencias significativas ($p < 0,05$) en PaO₂ basal entre pacientes con FPI según la calidad de muestras.

^eDiferencias significativas ($p < 0,05$) en $\Delta AaPO_2$ entre pacientes con FPI según calidad de muestras.

^fLas muestras excluidas (4) corresponden a pacientes con LES.

^gDiferencia significativa ($p < 0,05$) en PR entre pacientes con NI-EC según la calidad de muestras.

^hAislamiento de *M. tuberculosis* en estudio necrópico.

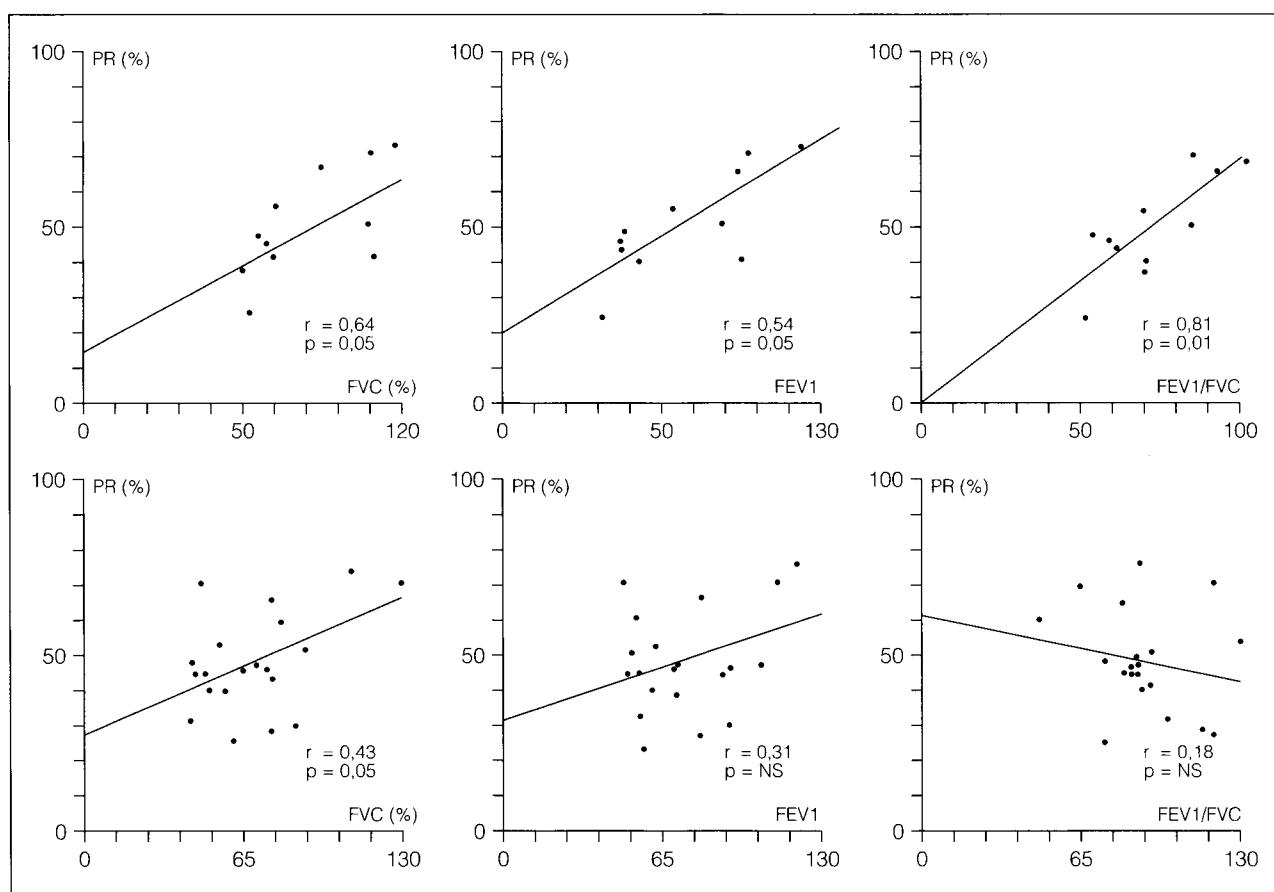


Fig. 1. Correlación entre porcentaje de fluido recuperado y datos espirométricos en pacientes con buena tolerancia del procedimiento; A, B y C corresponden al grupo control, D, E y F a enfermos con fibrosis pulmonar idiopática.

TABLA V
Concentración celular y distribución celular en el lavado broncoalveolar

	N	Concentración celular ($\times 10^3/\text{ml}$)	Macrófagos (%)	Linfocitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinofilia (%)
ND-VIH						
Fum	50	692,4 \pm 150	69 \pm 3,0	21,7 \pm 2,0	8,5 \pm 2,0	< 1
No fum	22	315,4 \pm 48,3	66 \pm 4,7	29,6 \pm 3,7	7,6 \pm 2,5	< 1
No adec*		95,3 \pm 5,2	-	-	-	-
FPI						
Fum	18	500,0 \pm 256	64 \pm 10	8,6 \pm 2,9	25 \pm 5,2	2,1 \pm 0,9
No fum	16	276,0 \pm 62,1	74 \pm 4,2	12,6 \pm 2,6	12 \pm 3,2	2,3 \pm 0,7
No adec*		81,0 \pm 4,9	-	-	-	-
SARC						
Fum	3	405,3 \pm 169	52 \pm 5,4	43,3 \pm 6,7	3,6 \pm 0,6	1,2 \pm 0,3
No fum	7	346,2 \pm 60,1	52 \pm 4,7	45,0 \pm 4,6	2,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,1
NH						
No fum	10	404,7 \pm 76	41 \pm 7,7	56,0 \pm 6,6	2,9 \pm 0,7	1,7 \pm 0,6
NI-EC						
No fum	17	448,0 \pm 15,2	78 \pm 5,2	16,1 \pm 3,3	5,3 \pm 3,0	1,3 \pm 0,5
No adec*		65,6 \pm 4,6	-	-	-	-
SChStr						
No fum	1	450,0	10	10	20	60
NEC						
No fum	1	703,0	21	5	19	55
Control						
Fum	7	724,1 \pm 227	88 \pm 3	5,2 \pm 1,3	6,6 \pm 2,8	<1
No fum	7	143,3 \pm 11,6	90 \pm 2	8,2 \pm 1,8	1,2 \pm 0,2	<1

*No adec: muestras no adecuadas para estudio. Los datos de celularidad se muestran como media \pm error estándar. Abreviaturas como en tabla III. Fum: fumador; No fum: no fumador.

El hábito tabáquico no mostró en ninguno de los grupos asociación significativa con la calidad de las mismas.

Relación entre porcentaje de fluido recuperado y función respiratoria

La correlación entre ambas variables en los pacientes con buena tolerancia se muestra en la figura 1. En el grupo control se encontró una correlación significativa del PR con la FVC ($r = 0,64$; $p < 0,05$), con el FEV1 ($r = 0,63$; $p < 0,01$) y con el índice FEV1/FVC ($r = 0,81$; $p < 0,01$). En el grupo con FPI sólo se observó correlación entre el PR y la FVC ($r = 0,63$; sin significación). En el resto de grupos no se evidenció ninguna correlación.

Asociación entre porcentaje recuperado y calidad de muestras

En la figura 2 se representa la asociación entre PR y calidad de muestras. El límite de corte utilizado corresponde al valor inferior del intervalo de confianza del 95% del PR en el grupo control. En pacientes con ND-VIH se observó una asociación de la calidad de muestras con la tolerancia de la técnica ($p < 0,05$) pero no con el PR, mientras que en sujetos con FPI se comprobó una asociación de la calidad de muestras tanto con la tolerancia del procedimiento ($p < 0,05$) como con el PR ($p < 0,005$).

Efecto de la infección asociada sobre la calidad de muestras del lavado broncoalveolar

En el grupo con ND-VIH se aisló algún patógeno en el 70% de los casos (tabla IV). Al comparar los casos con muestras útiles y aquellos en los que fueron desestimadas, no se han encontrado diferencias en cuanto a frecuencia de aislamiento de *Pneumocystis carinii* (28 frente a 29%), micobacterias (8,5 frente a 10%), bacterias (17 frente a 12%), hongos (3 frente a 2,5%) y coinfecciones graves (11 frente a 15%). Tampoco hubo diferencia en la frecuencia de aislamientos negativos (28 frente a 32%). En el grupo con FPI, sólo en un caso se aisló *Staphylococcus pneumoniae* en muestras de LBA y cepillo estéril; la muestra de LBA mostró incremento de células epiteliales y claro exudado con mucina y neutrófilos. En los casos con NI-EC, las 4 muestras excluidas correspondían a pacientes con LES. En uno de ellos se aisló *Micobacterium tuberculosis*. En el resto de grupos no se aisló ningún patógeno.

Hallazgos citológicos en muestras idóneas y excluidas

En la tabla V se muestran los datos de celularidad. El hábito tabáquico aumenta claramente la concentración celular en NI-VIH, FPI y en el grupo control y modifica la distribución celular. Los tipos de patología en las cuales el daño pulmonar se aparece en el LBA por incremento de neutrófilos fueron en las que se observó mayor frecuencia de muestras no adecuadas. En estos

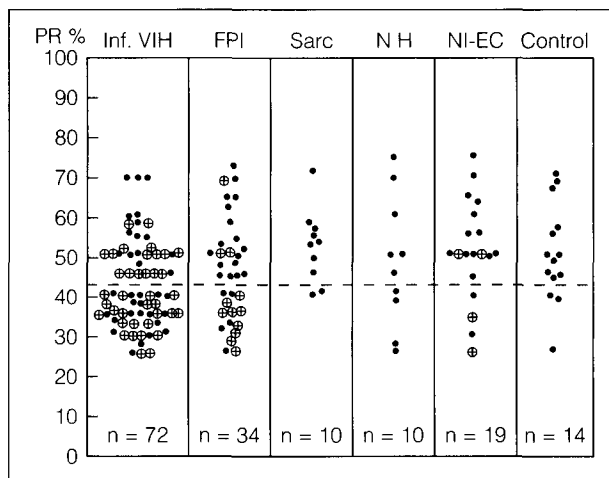


Fig. 2. Asociación entre porcentaje de fluido recuperado (PR) y calidad de muestras. La línea de puntos en el 43% corresponde al límite inferior del intervalo de confianza del 95% para el PR obtenido en el grupo control. Sólo en el grupo con FPI existe una asociación significativa ($p < 0,005$) entre ambas variables para el valor de PR señalado (* muestras adecuadas; + muestras no útiles). Abreviaturas como en la tabla III.

casos, un número importante de éstas presentaron una concentración celular $< 100,000$ céls/ml de fluido recuperado.

En procesos de tipo granulomatoso y en los casos con eosinofilia pulmonar, la concentración celular resultó por lo general alta y se observó una expansión muy evidente de la población linfocitaria y de eosinófilos, respectivamente.

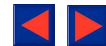
En pacientes con ND-VIH las muestras excluidas presentaron, por lo general, abundante detritus, escasa viabilidad, fragmentación nuclear, escasez de macrófagos e incremento de CEB con frecuentes cambios morfológicos que dificultan su distinción de otras células no epiteliales.

En los casos con FPI, las muestras no aptas presentaron, de forma común, escasa concentración celular, incremento de CEB, reducción de células macrofágicas y, en ocasiones, conglomerados de mucina y neutrófilos.

En el grupo con NI-EC, las muestras excluidas se obtuvieron de pacientes con LES. En todos los casos el aspecto fue serohemorrágico en mayor o menor intensidad. En el estudio microscópico se observó gran cantidad de hematíes y un porcentaje importante de macrófagos cargados con hemosiderina. La utilidad clínica de este hallazgo es bien clara al definir una hemorragia alveolar difusa y, por lo tanto, carece de relevancia el estudio de otras series celulares.

Relación entre deterioro funcional y calidad de las muestras

Con el fin de determinar si el estudio de calidad excluye selectivamente a pacientes según el grado de deterioro funcional, se valoraron las diferencias en parámetros funcionales en ambos tipos de muestras. El gradiente alveolo-arterial ($\Delta A-a$) de O_2 más elevado se observó en el grupo de pacientes con neumopatía asociada a infección



VIH y en el grupo con FPI ($31,2 \pm 15$ y $29,1 \pm 13,2$, respectivamente). Sólo en el grupo con FPI se observó una diferencia significativa en el valor del ΔA -a de O_2 y en los niveles de PaO_2 basal entre los casos con muestras adecuadas y aquellos en los que no fueron idóneas para estudio ($33,3 \pm 12$ frente a 19 ± 10 ; $p < 0,01$ y $66,4 \pm 11$ frente a $80,1 \pm 12$; $p < 0,05$, respectivamente) (tabla IV). Ningún otro parámetro funcional mostró diferencias significativas.

Discusión

Aunque es difícil lograr la estandarización absoluta de la técnica de obtención y procesamiento de muestras de LBA, cada vez son más conocidos los factores que pueden originar variabilidad en su estudio⁵⁻¹⁴. Sin embargo, algunos aspectos esenciales de la metodología, como son el estudio de calidad de muestras de LBA y la selección de las no representativas del tracto respiratorio inferior, no se han valorado suficientemente.

Tampoco hay unanimidad en cuanto a la forma de realizar dicha selección. Rankin et al² plantearon como criterio para definir una muestra de LBA como no representativa del pulmón profundo, la que contenía un número total de células $< 2 \times 10^6$. Sin embargo, los criterios descritos por Chamberlain et al³ resultan más exigentes ya que valoran los cambios en la morfología celular además de los criterios de representación (presencia de macrófagos alveolares como marcador de muestra alveolar y de CEB como marcador de muestra bronquial). Con la aplicación de ambos tipos de criterios, la incidencia de especímenes no idóneos para estudio fue del 5,1 y 30,4%, respectivamente.

Habitualmente el criterio más empleado es el incremento en el porcentaje de CEB. Su límite alto está aún por definir; no obstante, Klech y Pohl¹⁴ han sugerido que $\geq 5\%$ de CEB indica una excesiva "contaminación" con contenido celular de vía aérea proximal. Sin embargo, este parámetro resulta simplista y en ocasiones difícil de aplicar. En nuestra experiencia y en la de otros autores¹⁵, el recuento de estas células en determinados casos es muy difícil por los cambios morfológicos originados tras su procesamiento, lo que dificulta su distinción de otras células no epiteliales y por lo tanto, es posible que se infravalore su cuantía.

Con los criterios empleados en nuestro estudio³ se ha observado un porcentaje alto de muestras de LBA no idóneas para estudio, con especial incidencia en la neumopatía asociada a infección por el VIH y en FPI. Tanto en los pacientes con patología granulomatosa como en los casos aislados de eosinofilia pulmonar, en los cuales histológicamente es habitual que exista una participación bronquial en el proceso inflamatorio, todas las muestras fueron útiles. También en el grupo control, a pesar de estar constituido, en parte, por pacientes fumadores con enfermedad obstructiva de la vía aérea, todas las muestras resultaron adecuadas.

La intolerancia del procedimiento determina un descenso significativo en el PR. Pero, además, otros factores distintos pueden influir sobre este parámetro. Así, hemos comprobado una correlación entre éste y los da-

tos espirométricos, sobre todo en el grupo control en el que existían pacientes no fumadores y fumadores con distintos grados de obstrucción. En estudios previos¹⁶, se ha observado también esta correlación, lo que indica que el PR está determinado, al menos en parte, por el grado de obstrucción de la vía aérea. En otros grupos (patología predominantemente fibrótica o de tipo granulomatosa), con deterioro funcional de tipo restrictivo, no se observó esta correlación. Una posible explicación para ello es que en los casos más evolucionados a fibrosis, la alteración en la arquitectura pulmonar y la distorsión de la vía aérea pueden permitir la entrada del fluido aunque no su adecuada recuperación.

Existe, además, una gran variabilidad interindividual en el PR. En un amplio estudio en población homogénea de sujetos normales no fumadores¹², la variabilidad de este parámetro parece explicar en parte las grandes diferencias entre individuos en cuanto a recuperación celular.

Si la intolerancia se muestra por tos resistente al efecto del anestésico local, el BF puede descolocarse y provocar traumatismos en la mucosa con la consiguiente descamación de CEB y reducción de células macrófagas. En este sentido, hemos comprobado también una asociación entre tolerancia de la técnica y calidad de muestras. Como ha sido sugerido recientemente por Taskinen et al (1992), la "contaminación" de CEB se minimiza cuando la celularidad total que se recupera es alta y se incrementa en los casos con PR y escasa celularidad total¹⁵. Nuestros datos confirman estos resultados al observar que las muestras no útiles presentan escasa concentración celular y altos porcentajes de CEB. En los casos con porcentajes menores, cercanos a los establecidos del 5%, creemos que el tanto por ciento de CEB debe ser valorado en el contexto de la concentración y distribución celular y no como un parámetro aislado excluyente.

Los criterios empleados en nuestro estudio³ resultan más flexibles y al mismo tiempo más útiles ya que no sólo permiten definir la muestra como de "nivel alveolar", sino que además valoran aspectos como recuperación celular, hemorragia, inflamación de vía aérea y cambios celulares por procesamiento. La identificación de contenido de vía aérea, aunque resta representatividad a la muestra, tiene, sin embargo, gran utilidad clínica al definir una inflamación en la vía aérea concomitante¹⁶ y, por lo tanto, ha de ser valorada individualmente y no necesariamente despreciada⁴.

La patología subyacente muy probablemente determina la calidad de las muestras obtenidas. En los casos de neumopatía asociada a infección por VIH, se debe prever la obtención de un porcentaje importante de muestras no aptas para estudio. Aunque esto no es una limitación para el estudio microbiológico, sí lo es cuando el LBA se realiza con el fin de acceder al estudio de la inmunidad local pulmonar. En este sentido, algunos patrones de "alveolitis" en el fluido de LBA en esta población (linfocitosis y/o neutrofilia) son útiles clínicamente ya que se han asociado con infección por determinados tipos de patógenos e incluso pueden tener valor pronóstico¹⁷⁻²¹. En esta población, el incremento



de CEB como único parámetro para invalidar una muestra de LBA no resulta útil ya que con frecuencia es difícil distinguir estas células de otras no epiteliales, sobre todo cuando presentan rotura con eliminación de la parte ciliada, hiperplasia o atipia reactiva. En otros casos se observan, además, detritus, rotura celular y pobreza absoluta de macrófagos, hallazgos que inutilizan una muestra para estudio. Por otra parte, en esta población no se han observado diferencias entre las muestras idóneas y excluidas en cuanto a frecuencia de aislamientos únicos o de coinfecciones. Esto induce a pensar que otros factores más difíciles de valorar como la diferente intensidad de la respuesta inflamatoria y por lo tanto del daño pulmonar pueden determinar la calidad del espécimen obtenido.

En los pacientes con patología granulomatosa y en los casos con eosinofilia pulmonar, a pesar de la ausencia de hábito tabáquico, la celularidad obtenida fue muy alta con una clara expansión de la población linfocitaria y de eosinófilos, respectivamente. En estos procesos la alta concentración celular recuperada puede minimizar la influencia de factores metodológicos o del contenido de la vía aérea más proximal.

En los casos con FPI, el criterio de exclusión más frecuente fue un incremento de CEB y una escasa "alveolitis". Las muestras excluidas se obtuvieron generalmente de pacientes con intolerancia al procedimiento.

Aunque el grado de tolerancia parece un factor determinante de la calidad de muestras en esta patología, otros factores pueden condicionarla.

El hábito tabáquico fue más frecuente entre los sujetos en los que se obtuvieron muestras no idóneas pero no se ha observado asociación con la calidad de las mismas. Más aún, el incremento de la celularidad total y concentración celular en fumadores puede minimizar el componente celular de la vía aérea proximal. Sin embargo, cuando existe inflamación de la vía aérea añadida, puede invalidarse la muestra para el estudio.

En pacientes con conectivopatías, sobre todo en aquellos con LES es frecuente el desarrollo de daño alveolar difuso con hemorragia pulmonar. El LBA facilita el diagnóstico de esta y otras complicaciones. En otras conectivopatías de curso más crónico, la obtención de muestras adecuadas tiene interés dado que el LBA puede detectar alveolitis subclínicas y puede resultar útil en el seguimiento terapéutico y en la valoración pronóstica de la afectación pulmonar²².

Desde el punto de vista funcional, sólo en FPI hemos encontrado diferencias significativas según la calidad de muestras. En los pacientes con muestras excluidas se encontró una PaO₂ basal media significativamente mayor que la observada en sujetos con muestras idóneas y un menor gradiente alveoloarterial. Aunque estos datos inducen a pensar que las muestras excluidas corresponden a pacientes con menor deterioro funcional, debe tenerse en cuenta que estos parámetros funcionales son el resultado final de diferentes mecanismos implicados en la alteración del intercambio gaseoso en esta y en el resto de patologías intersticiales²³ y que su estudio, exclusivamente en reposo, valora muy inespecíficamente la extensión y gravedad de la anomalía histopatológica.

En recientes estudios de relación entre estructura y función en pacientes con FPI²⁴ se ha observado una correlación inversa entre el grado de "descamación" celular en el espacio alveolar y en la capacidad de difusión y una correlación dependiente del antecedente de tabaquismo entre la celularidad en el espacio alveolar y el gradiente A-a de O₂. Aunque estos datos no son totalmente extrapolables a nuestro estudio, es posible que las muestras de LBA excluidas en esta patología, por lo general de escaso volumen y poca carga celular, procedan selectivamente de zonas con menor componente descamativo o bien de zonas con mayor distorsión donde el fluido de LBA es retenido y por lo tanto ineficaz.

Por otra parte, en estudios previos se demostró que el LBA muestrea adecuadamente los tipos y la función de las células existentes en el espacio alveolar e intersticio pulmonar en FPI y en otras neumopatías²⁵⁻²⁷. Sin embargo, es bien conocida la falta de homogeneidad de afectación en muestras de biopsia pulmonar, tanto en FPI^{28,29} como en otras neumopatías evolucionadas y, además, se ha observado una falta de correlación en la celularidad entre muestras de LBA obtenidas en distintos segmentos^{6,30,31}. Dadas las implicaciones clínicas que conlleva el estudio de muestras de LBA en esta patología junto a la biopsia pulmonar^{32,33}, parece necesario que éstas cumplan claramente criterios de calidad. Por este motivo, en el estudio de una neumopatía evolucionada a fibrosis, creemos necesario obtener muestras de diferentes segmentos, más aún cuando el LBA inicial es mal tolerado y el PR es escaso.

En definitiva, es previsible un porcentaje importante de muestras de LBA no adecuadas para estudio, sobre todo en infectados por el VIH y en pacientes con FPI. La calidad de muestras está determinada tanto por la patología subyacente como por factores como la tolerancia de la técnica. Este último factor debe tenerse en cuenta durante la realización del procedimiento y en la interpretación de los resultados. Por otra parte, sugerimos que el porcentaje de CEB no debería ser empleado como único criterio para determinar si una muestra de LBA es o no representativa y, en todo caso, este dato debería ser valorado individualmente teniendo siempre en cuenta la tolerancia de la técnica, el porcentaje recuperado y la concentración celular total.

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. Rankin JA, Naegel GP, Reynolds HY. Use of a central laboratory for the analysis of bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 186-190.
3. Chamberlain DW, Braude AC, Rebeck AS. A critical evaluation of bronchoalveolar lavage. Criteria for identifying unsatisfactory specimens. *Acta Cytol* 1987; 31: 599-605.
4. Rennard SI, Ghafouri MO, Thompson AB et al. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 208-217.
5. Pingleton SJ, Harrison GF, Stechschulte DJ, Wesselius LJ, Kirby GR, Ruth WE. Effect of location, pH and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 1.035-1.037.



6. García JGN, Wolven RG, García P, Keough BA. Assessment of interlobar variation of bronchoalveolar lavage differentials in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 444-449.
7. Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bitterman PB, Crystal RG. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 650-658.
8. Mordelet-Dambrine M, Arnoux A, Stanislas-Leguern G, Sundran D, Chretien J, Huchon G. Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 305-306.
9. Baughman R, Strohofer S, Kim CK. Variation of differential cell counts of bronchoalveolar lavage fluid. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 341-343.
10. Fleury-Feith J, Escudier E, Pocholle MJ, Carre CH, Bernaudin JF. The effects of cytocentrifugation on differential cell counts in samples obtained by bronchoalveolar lavage. *Acta Cytol* 1987; 31: 606-610.
11. Helmers RA, Dayton CS, Floerchinger C, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease: effect of volume of fluid infused. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1.443-1.446.
12. Ettenshon DB, Jankowski MG, Duncan PG, Lalor PA. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. *Chest* 1988; 94: 275-280.
13. Moumouni H, Garaud P, Diot P, Lemarie E, Anthonioz P. Quantification of cell loss during bronchoalveolar lavage fluid processing. Effects of fixation and staining methods. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 636-640.
14. Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 1989; 2: 561-585.
15. Taskinen E, Tukiainen P, Renkonen R. Bronchoalveolar lavage. Influence of cytologic methods on the cellular picture. *Acta Cytol* 1992; 36: 680-686.
16. Thompson AB, Rennard SI. Assessment of airways inflammation utilizing bronchoalveolar lavage. *Clin Chest Med* 1988; 9: 635-642.
17. Agostini C, Zambello R, Trentin L, Poletti V, Spiga L, Gritti F et al. Prognostic significance of the evaluation of bronchoalveolar lavage cell populations in patients with HIV-1 infection and pulmonary involvement. *Chest* 1991; 100: 1.601-1.606.
18. Smith RL, El-Sadr WM, Lewis ML. Correlation of bronchoalveolar lavage cell populations with clinical severity of *Pneumocystis carinii* pneumoniae. *Chest* 1988; 92: 60-64.
19. Mason GR, Hashimoto CH, Dickman PS, Fouty LF, Cobb CJ. Prognostic implications of bronchoalveolar lavage neutrophilia in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1.336-1.342.
20. Jensen BN, Lisse IM, Gerstoft J, Borgeskof S, Skinhoj P. Cellular profiles in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients with pulmonary symptoms: relation to diagnosis and prognosis. *AIDS* 1991; 5: 527-533.
21. Agostini C, Semenzato G. Does analysis of bronchoalveolar lavage fluid provide a tool to monitor disease progression or to predict survival in patients with HIV-1 infection? *Thorax* 1994; 49: 848-851.
22. Wallaert B, Hoorelbeke A, Sibille Y, Rossi GA. The clinical role of bronchoalveolar lavage in collagen-vascular diseases. *Eur Respir Rev* 1992; 2: 64-68.
23. Agustí AGN, Roca J, Gea J, Wagner PD, Xaubert A, Rodríguez-Roisín R. Mechanisms of gas exchange impairment in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 219-225.
24. Cherniack RM, Colby TV, Flint A, Turlbeck WM, Waldron JA, Ackerson L et al. Correlation of structure and function in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1.180-1.188.
25. Haslam PL, Turton CWG, Heard B, Lukoszek A, Collins JV, Salisbury AJ et al. Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: comparison of cells obtained with lung biopsy and clinical features. *Torax* 1980; 35: 9-18.
26. Hunninghake GW, Kawanami O, Ferrans VJ, Young RC Jr, Roberts WC, Crystal RG. Characterization of the inflammatory and immune effectors cells in the lung parenchyma of patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 407-412.
27. Paradis IL, Dauber JH, Rabin BS. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 855-860.
28. Crystal RG, Fulmer JD, Roberts WC, Moss ML, Line BR, Reynolds HY. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. *Ann Intern Med* 1976; 85: 769-788.
29. Katzenstein ALA, Askin FB. Surgical pathology of non-neoplastic lung diseases. Philadelphia: WB Saunders, 1990; 58-96.
30. Peterson MW, Nugent KM, Jolles H, Monick M, Hunninghake GW. Uniformity of bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 79-84.
31. Cantin A, Begin R, Rola-Pleszczynski M, Boileau R. Heterogeneity of bronchoalveolar alveolar cellularity in Stage III pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1983; 83: 485-486.
32. Rudd RM, Halam PL, Turner-Warwick M. Cryptogenic fibrosing alveolitis: relationship of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to treatment and prognosis. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 1-8.
33. Watters LC, Schwarz MI, Cherniack RM, Waldron JA, Dunn TL, Stanford RE et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationship with lung histopathology and clinical response to therapy. *Am Rev Respir Dis* 1987; 153: 696-704.