



**CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS, CITOMÉTRICAS Y MICROBIOLÓGICAS  
DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES CON HEMOPATIAS  
MALIGNAS E INSUFICIENCIA RESPIRATORIA**

**Contribución al diagnóstico y tratamiento de las infecciones  
broncopulmonares**

**DRA. CHRISTELLE FERRÀ/DRA. BLANCA XICOY**

**DRA. NEREA CASTILLO**

**Clinical Hematology Department**

**Institut Català d'Oncologia**

**Hospital Germans Trias i Pujol**

**José Carreras Leukemia Research Institute**

**Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona**

**(Barcelona) Spain**

## INDICE

---

	Página
1. RESUMEN	3
2. FUNDAMENTOS Y OBJETIVO	4
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIAL Y METODO	9
5. BIBLIOGRAFIA	12
6. DURACION DEL PROYECTO	14
7. PRESUPUESTO	15

## 1. RESUMEN

---

Los pacientes con hemopatías malignas (HM) que, debido a su situación de inmunodepresión grave desarrollan fiebre e infiltrados pulmonares, tienen riesgo de presentar insuficiencia respiratoria bajo tratamiento antibiótico convencional. Las complicaciones respiratorias comprometen la supervivencia de estos pacientes, pero a menudo no se dispone de confirmación diagnóstica. Los hongos filamentosos son una causa frecuente de insuficiencia respiratoria. Sin embargo, también puede ser debida a gérmenes gramnegativos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Stenotrophomonas maltophilia*. La ampliación del espectro antimicrobiano y una tomografía computarizada (TC) torácica de alta resolución realizada de forma precoz mejoran el pronóstico de los pacientes. La detección del antígeno galactomanano (AGA) del hongo *Aspergillus fumigatus* o las técnicas de PCR para amplificar el ADN circulante de virus y hongos, en sangre, en el lavado bronco-alveolar (LBA) o en piezas de tejido, pueden facilitar el diagnóstico. El LBA ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de las complicaciones pulmonares de pacientes inmunodeprimidos, con identificación del germen patógeno en aproximadamente la mitad de los casos. El LBA guiado por la TC torácica es útil para identificar microorganismos como bacterias multirresistentes, hongos filamentosos y *Pneumocystis jiroveci* [1-4].

El paciente con HM e insuficiencia respiratoria merece especial atención. El objetivo de este proyecto es, por un lado, intentar optimizar los resultados del LBA a través de una revisión de los LBA realizados en este tipo de pacientes entre los años 2008 y 2013 y un estudio prospectivo de los mismos durante el 2014 para intentar correlacionar su patrón citológico, citométrico (cociente linfocitos CD4/CD8) y microbiológico con los hallazgos clínicos y microbiológicos sistémicos.

## 2. FUNDAMENTOS Y OBJETIVO

---

En pacientes con HM existe una inmunodepresión de base que aumenta con los tratamientos administrados especialmente cuando los enfermos reciben un trasplante de progenitores (TPH) alogénico. El espectro de infección es muy amplio e incluyen desde infecciones bacterianas convencionales a infecciones oportunistas. Las infecciones son la principal causa de mortalidad en pacientes con HM.

Las infecciones bacterianas son muy frecuentes en presencia de neutropenia aguda y profunda, mucositis y accesos venosos centrales. Los gérmenes grampositivos suponen el 60% de las bacterias aisladas y son especialmente frecuentes el *Staphylococcus plasmocoagulasa* negativo, el *Staphylococcus aureus*, los estreptococos del grupo *viridans* y el *Enterococcus*. Los gérmenes gramnegativos más frecuentes son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Ésta última y la *Stenotrophomonas maltophilia* pueden ser resistentes a los antibióticos convencionales.

Entre las infecciones víricas, la neumonía intersticial por citomegalovirus es una complicación grave con una alta mortalidad, especialmente en los pacientes que reciben un TPH alogénico. Hoy en día la letalidad se ha reducido gracias a las nuevas estrategias de prevención y tratamiento anticipado. Los virus influenza, parainfluenza y virus respiratorio sincitial pueden provocar neumonía con una elevada mortalidad en pacientes receptores de un TPH alogénico. El herpes virus humano 6 (VHH6) puede causar neumonía intersticial en pacientes inmunodeprimidos; sin embargo, en la mayoría de casos el VHH6 identificado en el LBA por PCR es un co-patógeno y como patógeno único se asocia a enfermedad vírica diseminada. Por último, el adenovirus y virus herpes simple pueden provocar también neumonitis.

En la actualidad, las infecciones fúngicas invasivas (IFI) son la principal causa de fallecimiento de los pacientes con HM muy inmunodeprimidos. El *Aspergillus spp.* puede provocar una infección invasora, aspergilosis broncopulmonar alérgica (fiebre, tos, broncoespasmo e imágenes típicas algodonosas en la fibrobroncoscopia) y aspergilomas. De todas formas, lo más recurrente en pacientes inmunodeprimidos y que interesa diagnosticar precozmente son las aspergilosis invasoras *per sé*. Por otro lado, hoy en día están en auge las llamadas infecciones fúngicas emergentes debido a la intensificación de los tratamientos asociada a la mejoría del tratamiento de soporte.

En el paciente inmunodeprimido se debe descartar también la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y por otras micobacterias atípicas, que suelen presentarse como infección pulmonar o infección diseminada.

Las complicaciones pulmonares son muy frecuentes en pacientes con HM. El pulmón es uno de los órganos más frecuentemente afecto, bien por la propia enfermedad o bien por complicaciones infecciosas. También puede verse afectado por enfermedad de injerto contra huésped o lesión inducida por fármacos y/o radioterapia. Así mismo, otro tipo de patología pulmonar a descartar es la proteinosis alveolar. Las complicaciones pulmonares ocurren en un 40%-60% de los pacientes con HM durante la evolución de su enfermedad.

Dado que el tratamiento de estas complicaciones pulmonares es muy diferente, la principal preocupación en esta situación es llegar al diagnóstico preciso. A pesar de la mejoría del tratamiento de soporte, la neumonía debida a una profunda y prolongada neutropenia y a inmunodeficiencia celular y/o humoral por quimioterapia y/o radioterapia es la principal causa de muerte no relacionada con la HM.

En relación a las infecciones, los procedimientos microbiológicos realizados de forma sistemática (examen del esputo, AGA en suero, antígenos bacterianos de *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* en orina, hemocultivos, urinocultivo) a menudo no permiten identificar la causa de la neumonía. Por ello, se realizan con frecuencia procedimientos invasivos como la broncoscopia y el LBA que, a pesar de que no están exentos

de toxicidad (hemorragia, neumotórax y sobreinfección), no suponen hoy en día un riesgo elevado para el paciente. El LBA debe ser dirigido y realizado en la zona mas patológica que se observe en la TC torácica [5].

En estos pacientes, se considera que la fibrobroncoscopia con LBA es una buena herramienta diagnóstica para el diagnóstico microbiológico de neumonía. La eficiencia de este procedimiento varía entre el 16% y el 90%, con identificación del germen patógeno en alrededor del 50% de los casos. La técnica tiene una baja frecuencia de complicaciones pese a realizarse en pacientes de riesgo por la asociación frecuente de trombocitopenia e inmunodepresión. La mortalidad disminuye cuando el LBA se realiza precozmente [6-9].

El aislamiento de un microorganismo en los cultivos de sangre, LBA o secreciones respiratorias y su relación con la clínica y los infiltrados pulmonares de la TC torácica debe ser interpretada con cautela para evitar modificaciones inadecuadas del tratamiento antimicrobiano. Se describe en algunos estudios que el LBA conlleva un cambio de tratamiento en aproximadamente la mitad de los casos [6-9].

En el LBA se pueden realizar estudios de citología, citometría de flujo y microbiología. El estudio citológico del LBA tiene una baja sensibilidad y sólo es orientativo en el diagnóstico. Por otro lado, un examen citológico normal no excluye anomalías microscópicas en el tejido pulmonar. La citología del LBA no tiene valor pronóstico ni predice la respuesta al tratamiento. Para el análisis citológico del LBA son necesarios un mínimo de 5 mL (idealmente entre 10 y 20 mL). Se recomienda realizar un conteo celular diferencial, que incluya macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Un conteo diferencial celular superior a 15% de linfocitos, 3% de neutrófilos, 1% de eosinófilos y 0,5% de mastocitos representa un patrón celular linfocítico, neutrofílico, eosinofílico y la presencia de una mastocitosis, respectivamente [5]. Para el análisis citológico se debe obtener un botón celular por citocentrifugación teñido con May Grünwald-Giemsa. El examen citológico del LBA permite identificar parásitos como *Leishmania* y hongos como el *Pneumocystis jirovecii* (Figura 1).

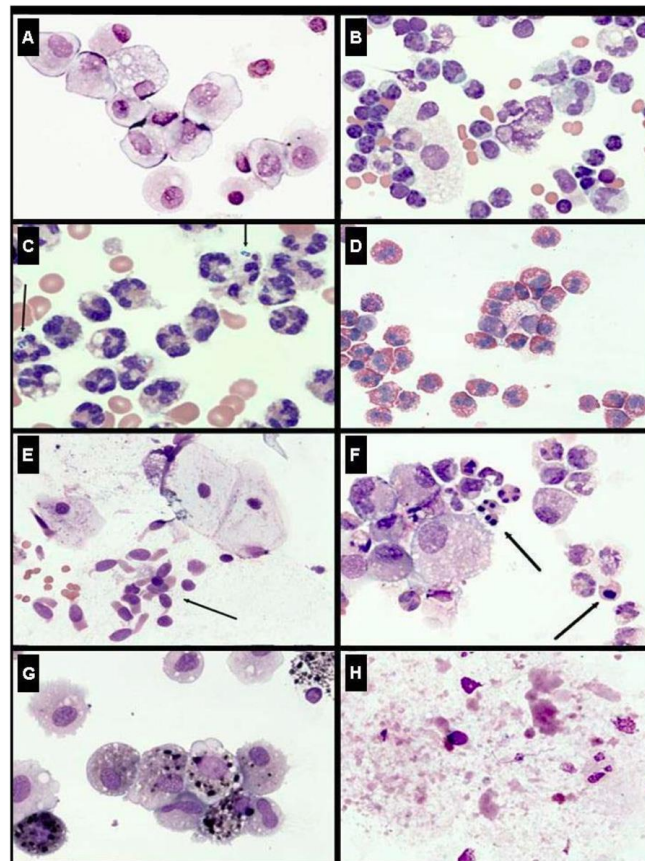


Figura 1. Preparaciones de LBA representativas-> (A) Predominio de macrófagos alveolares en una persona sana. (B) Linfocitosis. (C) Predominio de neutrófilos con bacterias intracelulares. (D) Eosinofilia. (E) Muestra insatisfactoria con células epiteliales escamosas (células grandes) y células epiteliales en degeneración (F) Macrófagos alveolares y neutrófilos en degeneración. (G) Macrófagos cargados de hemosiderina (hemorragia alveolar difusa). (H) Proteinosis alveolar.

Con la muestra de LBA también se pueden realizar estudios de citometría de flujo. Se pueden estudiar las poblaciones linfocitarias con el panel CD4, CD8, CD3, CD56 y CD19 y, posteriormente, los estudios se amplían según el criterio clínico. En presencia de linfocitopenia la sensibilidad de la técnica es limitada, por lo que sólo se procesan muestras con mínimo un 20% de linfocitos en la citología del LBA. También es posible detectar patógenos como el *Pneumocystis jirovecii* utilizando anticuerpos monoclonales específicos [10-12] (Figura 2).

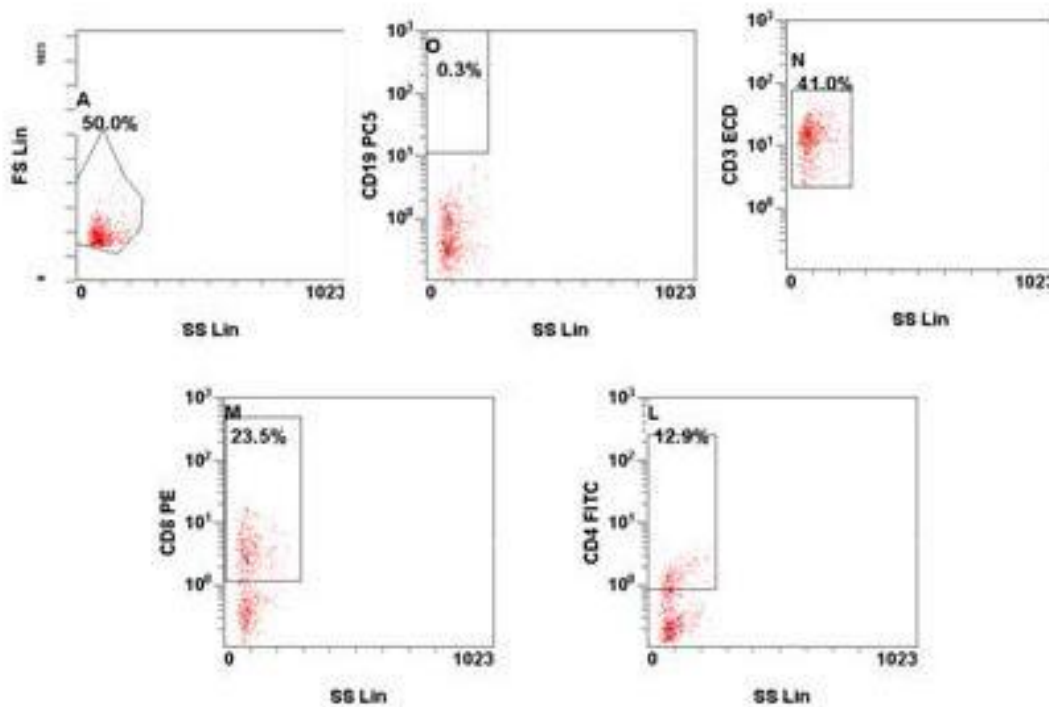


Figura 3. Citometría de LBA: predominio de linfocitos CD8+; escasa población B

Respecto a los estudios microbiológicos, y dado que el tratamiento antimicrobiano empírico se instaura sin demora en los pacientes con fiebre y neutropenia, puede limitar el aislamiento bacteriano en el cultivo cuantitativo del LBA [13] (Figura 3). En presencia de fiebre e inmunodepresión prolongada es obligado detectar de forma precoz la presencia de *Aspergillus fumigatus* mediante la determinación del AGA en el LBA, que tiene mayor sensibilidad que el AGA sérico [14-17]. El diagnóstico preciso se realiza por PCR pero esta técnica no parece tener una mejor validez diagnóstica [17-18]. La realización de ambas técnicas aumenta la sensibilidad sin detrimento de la especificidad. Una revisión sistemática y un meta-análisis de la detección de AGA en el LBA determinó que un valor de corte de 1.0 tenía mayor sensibilidad que la PCR y el AGA en suero [19]. La detección del AGA de la pared del *Aspergillus fumigatus*

se considera en la actualidad criterio de IFI. El cultivo micológico (medio de Sabouraud) del LBA puede permitir la identificación de otros tipos de hongos diferentes al *Aspergillus fumigatus*. El método de elección para el diagnóstico de neumonías víricas es la PCR; puede presentar falsos positivos, por lo cual es necesario que existan dos determinaciones positivas. Es una técnica especialmente útil en la fase de neutropenia. El cultivo de *shell-vial* para CMV es una técnica poco sensible, únicamente útil en el LBA [20]. Las micobacterias pueden identificarse con un cultivo en medio sólido (*Coletsos* y *Lowenstein-Jensen*) y líquido (BACTEC).



Figura 3. A. Empiema por *Legionella pneumophila*

B. Cultivo de *Legionella pneumophila*.





### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1 Principal**

Estudio prospectivo durante el 2014 para intentar definir el patrón citológico, citométrico y microbiológico del LBA en pacientes con HM e insuficiencia respiratoria y correlacionarlo con los hallazgos clínicos y microbiológicos sistémicos. En el caso de los pacientes receptores de un TPH se efectuará una correlación y con el estado de recuperación inmune post-TPH.

#### **3.2. Secundarios**

3.2.1 Revisión retrospectiva del patrón citológico, y microbiológico de broncoscopias realizadas en pacientes con HM e insuficiencia respiratoria entre los años 2008 y 2013 y correlación con los hallazgos clínicos y microbiológicos sistémicos.

3.2.2. Comparar el rendimiento de los LBA en ambos periodos (2008-2013 y 2014) a fin de valorar si la incorporación del estudio de subpoblaciones linfocitarias en el LBA mejora el rendimiento de dicha técnica en pacientes con HM, y con ello el pronóstico de los pacientes con infiltrados pulmonares.

---

## 4. MATERIAL Y METODO

---

### 4.1 Estudio retrospectivo

4.1.1 Sujetos a estudio: Pacientes con HM con semiología clínica y radiológica de neumonía a los que se haya realizado un LBA

Criterios de inclusión:

- Hemopatía maligna
- Presencia de infiltrados pulmonares en RX de tórax o Tomografía computarizada
- Insuficiencia respiratoria leve o moderada ( $pO_2 \geq 60$ mmHg)

Criterios de exclusión:

- Semiología evidente de insuficiencia cardiaca

4.1.2. Periodo de estudio: Enero 2008 y Diciembre 2013

4.1.3 Recogida de datos:

- Datos demográficos: edad, sexo
- Enfermedad hematológica: diagnóstico, fecha del diagnóstico, estado de la enfermedad, tratamientos previos, TPH (SI/NO), antecedente de neutropenia  $<0,5 \times 10^9/L$ , tratamiento concomitante (antibióticos, antivirales, antifúngicos, glucocorticoides, tratamiento inmunodepresor), presencia de enfermedad de injerto contra huésped activo (tipo y extensión)
- Gravedad de insuficiencia respiratoria:  $pO_2$  si gasometría arterial, Saturación  $O_2$ , requerimientos de oxígeno
- Exploración física: Temperatura, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca (media de las determinaciones de las 24 horas anteriores al LBA)
- Hallazgos radiológicos: radiología convencional y TC torácica
- Datos analíticos:
  - Recuento total y diferencial de los leucocitos, recuento plaquetar
- Microbiología: hemocultivos, cultivo de esputo, antígenos en orina y sangre (*Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*/*Aspergillus fumigatus*)
- Análisis del LBA:
  - Macroscópico

- Muestra valorable o no (por >5% de células epiteliales o con células epiteliales escamosas)
- Citología convencional: tinción de MayGrunwald-Giemsa para estudio celular (presencia de células malignas) y tinción de auramina para estudio de *Pneumocystis jirovecii*

## 4.2 Estudio prospectivo

4.2.1 Sujetos a estudio: Pacientes con HM con semiología clínica y radiológica de neumonía que vayan a ser sometidos a un LBA en el 2014

- Criterios de inclusión:

- Hemopatía maligna
- Presencia de infiltrados pulmonares en RX de tórax o Tomografía computarizada
- Insuficiencia respiratoria leve o moderada ( $pO_2 \geq 60$ mmHg)

- Criterios de exclusión:

- Semiología evidente de insuficiencia cardíaca
- Ausencia de consentimiento informado

4.2.2 Periodo de estudio: Enero 2014 y Diciembre 2014

4.2.3 Recogida de datos:

- Datos demográficos: edad, sexo
- Enfermedad hematológica: diagnóstico, fecha del diagnóstico, estado de la enfermedad, tratamientos previos, TPH (SI/NO), antecedente de neutropenia  $<0,5 \times 10^9/L$ , tratamiento concomitante (antibióticos, antivirales, antifúngicos, glucocorticoides, tratamiento inmunodepresor), presencia de enfermedad de injerto contra huésped activo (tipo y extensión)
- Gravedad de la insuficiencia respiratoria:  $pO_2$  si gasometría arterial, Saturación  $O_2$ , requerimientos de oxígeno
- Exploración física: temperatura, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca (media de las determinaciones de las 24 horas anteriores al LBA)
- Hallazgos radiológicos: radiología convencional y TC torácica
- Datos analíticos:

- Recuento total y diferencial de los leucocitos, recuento plaquetar
- Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica (determinación de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD 56)
- Proteína C reactiva, procalcitonina, VSG
- Dosificación de Inmunoglobulinas
- Microbiología: hemocultivos, cultivo esputo, antígenos en orina y sangre (*Streptococcus pneumoniae*, *Legionella neumophila* y *Aspergillus fumigatus*)
- Análisis del LBA: El LBA se realiza con un broncoscopio de fibra óptica en un segmento pulmonar afecto que se ha identificado mediante RX convencional o TC pulmonar. Para que la muestra sea valorable hay que instilar 100-300mL de suero salino 5% en forma de aliquotas y recuperar al menos un 30% de cada alícuota después de cada instilación (KC Meyer 2012, 5).
  - Macroscópico
  - Muestra valorable o no (por >5% de células epiteliales o con células epiteliales escamosas)
  - Citología convencional: tinción de MayGrunwald-Giemsa para estudio celular (presencia de células malignas) y tinción de auramina para estudio de *Pneumocystis jirovecii*
  - Microbiología: cultivos (bacteriano, hongos, vírico, TBC), antígenos (AGA, CMV, PCR virus)
  - Citometría de flujo: estudio de poblaciones linfocitarias si linfocitos >20% leucocitos (determinación CD3, CD4, CD8, CD19 y CD 56). Determinación del cociente CD4/CD8
- Biopsia pulmonar transbronquial
  - Diagnóstico: de sospecha/confirmado /incierto
  - Tratamiento aplicado: cambio de terapéutica
  - Evolución: desenlace del evento, ingreso en Unidad de Vigilancia Intensiva, necesidad de ventilación mecánica, causa directa de *exitus*

### 4.3 Análisis estadístico

Los datos se expresarán en forma de media  $\pm$  error estándar. Las tasas de supervivencia se compararán mediante el análisis de Kaplan-Meier seguido de un test log-rank. Las variables continuas con distribución normal serán comparadas entre sí en los diferentes grupos

utilizando el test de la t de Student con corrección de Bonferroni, mientras que las variables continuas sin distribución normal se analizarán utilizando el rank test de Wilcoxon con corrección de Bonferroni. Todos los datos se analizarán utilizando la versión 12.0 del paquete SPSS (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Se considerarán estadísticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5. BIBLIOGRAFIA

---

1. Maschmeyer G, Beinert T, Buchheidt D, et al. Diagnosis and antimicrobial therapy of pulmonary infiltrates in febrile neutropenic patients--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol.* 2003; 82 (Suppl 2): S118-26.
2. Maschmeyer G, Beinert T, Buchheidt D, et al. Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients: Guidelines of the infectious diseases working party of the German Society of Haematology and Oncology. *Eur J Cancer.* 2009; 45: 2462-72.
3. Gruson D, Hilbert G, Valentino R, et al. Utility of fiberoptic bronchoscopy in neutropenic patients admitted to the intensive care unit with pulmonary infiltrates. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2224-30.
4. Huaranga AJ, Leyva FJ, Signes-Costa J, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary complications of bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25: 975-9.
5. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 1004-14.
6. Cordani S, Manna A, Vignali M, Tascini C. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool in patients with hematological malignancies and pneumonia. *Infez Med.* 2008, 16: 209-13.
7. Rao U, Piccin A, Malone A, et al. Utility of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary infection in children with haematological malignancies. *Ir J Med Sci.* 2013; 182: 177-83.
8. Pagano L., Pagliari G, Basso A. et al. The role of bronchoalveolar lavage in the microbiological diagnosis of pneumonia in patients with haematological malignancies. *Ann. Med.* 1997; 29: 535-40.
9. Pereira Gomes J.C, Pedreira WLJ, Araujo E, et al. Impact of BAL in the management of pneumonia with treatment failure. *Chest.* 2000; 118: 1739-46.
10. Song JY, Filie AC, Venzon D, Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Flow cytometry increases the sensitivity of detection of leukemia and lymphoma cells in bronchoalveolar lavage specimens. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012, 82: 305-12.
11. Szpechcinski A, Kopinski P, Giedronowicz D, et al. Cytometric protocol of CD4+/CD8+ lymphocyte ratio assessment in bronchoalveolar lavage fluids from patients with interstitial lung diseases. *Anal Quant Cytol Histol.* 2011; 33: 289-96.
12. Barbosa J, Costa-de-Oliveira S, Silva AT, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Specific detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2013; 968: 203-11.

13. Kuehnhardt D, Hannemann M, Schmidt B, Heider U, Possinger K, Eucker J. Therapeutic implication of BAL in patients with neutropenia. *Ann Hematol.* 2009; 88: 1249-56.
14. Hsu LY, Ding Y, Phua J, et al. Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 44.
15. Heng SC, Morrissey O, Chen SC, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol.* 2013 Jun 25. [Epub ahead of print].
16. Racil Z, Kocmanova I, Toskova M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis.* 2011; 15: e874-81.
17. Buess M, Cathomas G, Halter J, et al. Aspergillus-PCR in bronchoalveolar lavage for detection of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 237.
18. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 3652-8.
19. Zou M, Tang L, Zhao S, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PLoS One.* 2012; 7: e43347.
20. Mariotte E, Schnell D, Scieux C, et al. Significance of herpesvirus 6 in BAL fluid of hematology patients with acute respiratory failure. *Infection.* 2011; 39: 225-30.

## **6. DURACION DEL PROYECTO**

---

Un año (diciembre 2013-enero 2015)

## **7. PRESUPUESTO**

---



**40 horas investigador predoctoral A**

<b>SALARIO-IMPORTE TOTAL (salario bruto 22.066 €+ cuota patronal 7.193 €)</b>	29.259 €
<b>COSTES INDIRECTOS</b>	3.000 €
<b>ASISTENCIA A VIAJES Y CONGRESOS</b>	3.000 €
<b>MATERIAL FUNGIBLE</b>	14.741€
<b>TOTAL</b>	50.000€