

Diagnóstico microbiológico en lavado broncoalveolar. Revisión de la literatura

Microbiological diagnosis in bronchoalveolar lavage. Literature review

Carlos Manuel Alzate-Rincón¹, Natalia Loaiza-Díaz² , Yudy Aguilar³ 

Resumen. El lavado broncoalveolar (LBA) se describió hace aproximadamente 50 años, y desde ese momento se ha venido empleando cada vez con más frecuencia, llegando a ser uno de los métodos de elección para hacer el diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias bajas, pues facilita la identificación de patógenos oportunistas y no oportunistas. Su uso se incrementó paralelamente con el número de pacientes inmunocomprometidos, sobre todo a causa del SIDA y los trasplantes, situaciones en las que con frecuencia los pacientes padecen infecciones pulmonares por gérmenes oportunistas. El LBA es un procedimiento seguro que permite obtener muestras que aportan información amplia de las características celulares y microbiológicas del tracto respiratorio inferior. Para garantizar su utilidad es fundamental que la recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras sean óptimos. El análisis de las muestras se hace por técnicas convencionales para identificación de microorganismos, como son las tinciones y el aislamiento en medios de cultivo, y por otros métodos tales como la inmunofluorescencia, pruebas inmunológicas para la detección de antígenos y anticuerpos, y pruebas de biología molecular. En la presente revisión, se hace una actualización sobre el procedimiento de obtención, almacenamiento y transporte de las muestras de LBA, así como de las técnicas de diagnóstico microbiológico más utilizadas para identificar los principales agentes infecciosos asociados con enfermedades del tracto respiratorio inferior.

Palabras clave: lavado broncoalveolar, diagnóstico, microorganismos, infecciones bacterianas y micosis, micobacterias, colorantes, infecciones respiratorias.

¹ Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. E-mail: carlosmalzate1@gmail.com.

² Médica, Especialista en Microbiología y Parasitología. Jefe de Patología Clínica, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

³ Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas (GRIFE), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Clínica Universitaria Bolivariana, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.

Conflicto de interés: los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Medicina & Laboratorio 2021;25:675-693. <https://doi.org/10.36384/01232576.523>.

Recibido el 18 de mayo de 2021; aceptado el 11 de septiembre de 2021. Editora Médica Colombiana S.A., 2021[©].

Abstract. Bronchoalveolar lavage (BAL) was described approximately 50 years ago and since then it has been used with increasing frequency, becoming one of the methods of choice for making the microbiological diagnosis of lower respiratory infections, as it facilitates the identification of opportunistic and non-opportunistic pathogens. Its use increased in parallel with the number of immunocompromised patients, especially due to AIDS and transplantation, situations in which patients frequently suffer from lung infections due to opportunistic germs. BAL is a safe procedure that allows obtaining samples that provide comprehensive information on the cellular and microbiological characteristics of the lower respiratory tract. Optimal collection, transport, storage and processing of samples is essential to guarantee its usefulness. Analysis of the samples is done both by conventional techniques for the identification of microorganisms, such as staining and isolation in culture media, as well as by other methods such as immunofluorescence, immunological tests for the detection of antigens and antibodies, and molecular biology assays. In this review, an update is presented on the procedure for obtaining, storing and transporting BAL samples, as well as on the most widely used microbiological diagnostic techniques to identify the main infectious agents associated with lower respiratory tract diseases.

Keywords: bronchoalveolar lavage, diagnosis, microorganisms, bacterial infections and mycoses, mycobacteria, staining, respiratory infections.

Introducción

El lavado broncoalveolar (LBA) es un procedimiento invasivo, de fibrobroncoscopia, bien tolerado en la mayoría de los pacientes, que fue popularizado en 1974 por los médicos estadounidenses Reynolds y Newban [1], debido a su utilidad para definir el diagnóstico de enfermedades del tracto respiratorio inferior, tanto infecciosas como intersticiales y tumorales, ya que permite obtener una muestra con adecuada representatividad celular, bioquímica y de microorganismos, para su posterior análisis en el laboratorio [2]. Este procedimiento ha cobrado importancia en las últimas décadas, debido al incremento de las patologías pulmonares en pacientes inmunocomprometidos.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica del LBA pueden acercarse al 100%, sin embargo, varían de acuerdo

al estado inmunológico del paciente, la sospecha clínica, la afectación pulmonar, el procedimiento de toma, transporte y almacenamiento de la muestra, el patógeno causante de la infección y la técnica usada para su detección [2]. Encontrar el patógeno involucrado en la infección, apoya el uso adecuado de antibióticos, disminuyendo el riesgo de eventos tóxicos por medicamentos, y los fallos terapéuticos debidos a la presencia de mecanismos de resistencia en los microorganismos [3].

El objetivo de esta revisión es describir el procedimiento de obtención, almacenamiento y transporte de muestras de LBA, así como las principales técnicas disponibles para el diagnóstico microbiológico de los agentes infecciosos frecuentemente asociados con enfermedad del tracto respiratorio inferior.

La muestra

El LBA es una muestra del tracto respiratorio bajo, que implica la instilación de solución salina estéril y su posterior extracción, en uno o varios segmentos pulmonares. El procedimiento para tomar esta muestra es invasivo, y se lleva a cabo con ayuda de un fibrobroncoscopio, que se ubica en los bronquios subsegmentales, seleccionados de acuerdo con los hallazgos imagenológicos del paciente. Una vez ubicado el sitio, se instilan entre 150 mL y 200 mL de solución salina isotónica (0,9%) estéril a temperatura ambiente, en fracciones de 20 mL a 50 mL en adultos. En los niños, algunos autores recomiendan de 10 mL a 20 mL independiente de la edad y tamaño del niño, pero hay otros que sugieren instilar 1 mL a 3 mL/kg, y si pesa más de 50 kg, hacer 3 instilaciones de 50 mL [2].

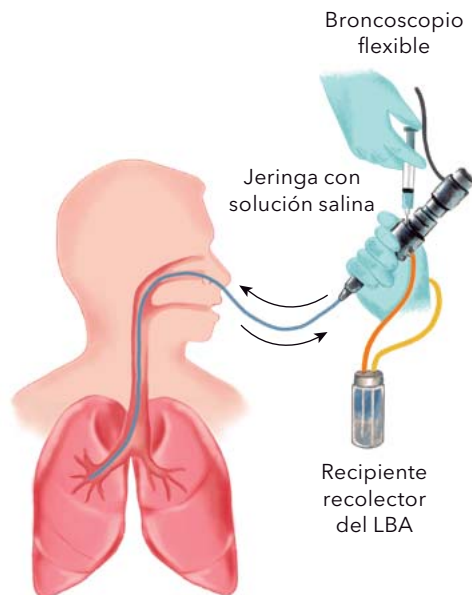


Figura 1. Procedimiento de lavado broncoalveolar.

Después de cada instilación, se debe aspirar con una presión suave de 20 cm H₂O, con el fin de evitar un colapso bronquial, para que al final del procedimiento se pueda recuperar aproximadamente entre el 30% al 50% del volumen instilado [4] (**figura 1**). Usualmente, se descarta la primera fracción de lo recuperado por contener células, secreciones y gérmenes del tracto respiratorio superior (muestra bronquial), y se recolectan las siguientes fracciones que son las consideradas representativas de los alvéolos bronquiales-vía respiratoria inferior. La recolección debe hacerse en un frasco plástico con tapa de rosca, que puede ser siliconado para evitar la adherencia de las células a la superficie [5]. Dependiendo de los estudios requeridos para cada paciente, se dividirá la muestra en las fracciones necesarias.

El procedimiento de fibrobroncoscopia para la obtención del LBA es realizado por un médico especialista en neumología, bajo sedación, con monitoreo de

los signos vitales y la oximetría. Si bien durante la fibrobroncoscopia se pueden presentar complicaciones como hemoptisis, neumotórax y saturación de O₂ <80%, son infrecuentes (<10%); durante la toma de muestras de LBA se reportan en menos del 1% [6], y dependen de la técnica y del tipo de muestra a obtener, aumentando el riesgo cuando se incluye la obtención de tejidos. Los niños presentan más complicaciones (13%), como tos, hemoptisis o desaturación, pero son de menor gravedad [7]. Esto lleva a que el LBA no sea de elección en pacientes con hipoxemia, trombocitopenia marcadas o inestabilidad hemodinámica [1].

Transporte y almacenamiento

De acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en inglés), y de la Sociedad Americana

de Microbiología [8], una vez recolectada la muestra de LBA, se debe conservar en el triple embalaje para transporte de sustancias de riesgo biológico. Lo ideal es procesar la muestra en el laboratorio en el transcurso de las primeras dos horas tras su recolección. Cuando esto no es posible, se debe conservar a 4 °C hasta 24 horas para favorecer la viabilidad celular [2], o usar aditivos dependiendo del germen y prueba a realizar.

Las muestras para cultivo bacteriológico y análisis microscópico [9] deben ser almacenadas durante 24 horas a 4 °C, máximo 48 horas, sin que se afecte la sensibilidad analítica para la gran mayoría de las bacterias patógenas y hongos. Si se requiere cultivo viral, la muestra debe transferirse a un medio de transporte especial para virus que contiene DMSO (dimetilsulfóxido) y proteínas como la albúmina bovina, para evitar el daño celular por la cristalización, además de estabilizadores de pH y antimicrobianos como gentamicina y anfotericina B, para minimizar el crecimiento microbiano en la muestra [10].

Cuando se requiere detectar virus y material genético, las muestras deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C hasta por 4 días, en caso de que el procesamiento se retrase se deberán almacenar a -70 °C. Cuando se requiera estudiar el viroma o microbioma pulmonar, se prefieren otros medios comerciales como el RNAlater® [11], ya que el suero fetal bovino es un contaminante para este tipo de estudios. Para la realización de cultivos celulares, las muestras se deben almacenar a -80 °C o en nitrógeno líquido, en función de su utilización futura [9,10].

Calidad de la muestra

Algunos autores consideran aceptable que el LBA corresponda a la recupe-

ración del 10% del volumen instilado durante la broncoscopia en niños, y del 30% en adultos, así como que al hacer el recuento celular diferencial en coloraciones como Wright o Giemsa, se observen escasas células epiteliales; menos del 1% [2,5]

Inicialmente, es importante valorar el aspecto macroscópico de la muestra, color, turbidez y presencia de moco. El color puede variar desde transparente blanquecino por moco, hasta rosa a rojo debido a la presencia de sangre. Cuando se centrifuga la muestra, el botón celular puede tener un color blanco o más oscuro, o incluso alcanzar un tono café a negro en los pacientes que fuman.

Para establecer la calidad de la muestra, Chamberlain y colaboradores proponen la evaluación microscópica [12] que se basa en el recuento celular de células epiteliales, macrófagos, eritrocitos y artefactos, y que considera que una muestra de LBA es representativa del tracto respiratorio inferior cuando contiene <1% de células epiteliales escamosas, pues cantidades superiores se relacionan con presencia de microbiota orofaríngea. Es difícil estandarizar los recuentos celulares para muestras de LBA, por la forma en que se obtiene la muestra, sin embargo, es aceptado que el recuento en personas normales tenga la siguiente distribución: macrófagos 80% a 95%, linfocitos <15%, neutrófilos 2% a 5%, y eosinófilos, basófilos y células plasmáticas ≤1% [13].

La observación de polimorfonucleares en la coloración de Gram, así como que el recuento de los microorganismos aislados en el cultivo sea superior a 10⁴ UFC/mL, están a favor de su relevancia clínica [14-17], aunque se discute que este valor no tiene en cuenta el factor de dilución de la muestra y posible exposición previa a antimicrobianos [18].

Técnicas de diagnóstico microbiológico en LBA

Examen directo

La preparación en fresco es útil para evaluar la presencia de parásitos como larvas de *Strongyloides stercoralis* o huevos de *Paragonimus* spp. [19,20]. También se pueden observar estructuras fúngicas de levaduras, hifas o pseudohifas sin colorantes, o resaltarlas con coloraciones simples como el azul de lactofenol, KOH o tinta china. Esta última es empleada para ver las levaduras capsuladas de *Cryptococcus neoformans* (figura 2)[21].

Tinciones

Las tinciones microbiológicas usadas rutinariamente por más de 100 años [22], aún se emplean de manera rutinaria para identificar el agente causante de la infección o, según las estructuras observadas, brindar un informe preliminar para que el médico tome decisiones y defina o ajuste la terapia empírica. Tienen la ventaja de estar al alcance de todos los laboratorios clínicos, debido a



Figura 2. Preparación de LBA en tinta china (40x). En el campo se observan las blastoconidias capsuladas de *Cryptococcus neoformans*. Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

su costo-beneficio, y a que los materiales, colorantes y el microscopio de luz, hacen parte de los elementos básicos de un laboratorio. En contraste, su rendimiento diagnóstico depende en gran medida del entrenamiento del personal que realiza el proceso, en especial la visualización microscópica.

Usualmente, las tinciones se realizan a partir del botón celular obtenido del proceso de centrifugación de la muestra total, pero el rendimiento diagnóstico mejora cuando el procesamiento se hace por citocentrifugación.

Tinción de Gram

La coloración de Gram es útil en el diagnóstico presuntivo de infecciones bacterianas, y brinda información al clínico para definir o ajustar el tratamiento inicial, en especial en los casos de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) o neumonía adquirida en la comunidad (NAC), en los que se pueden visualizar morfotipos asociados a ciertas bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*) (figura 3), así como Gram negativas (enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores). Tiene una sensibilidad que oscila entre 44% y 90%, y una especificidad entre 49% y 100%, siendo mayor su concordancia con el cultivo cuando se observan bacterias intracelulares [23,24].

En esta coloración también es posible observar estructuras filamentosas Gram positivas sugestivas de *Nocardia* spp., y de hongos como las hifas o blastoconidias de *Candida* spp., que también se tiñen Gram positivas. La presencia de estas últimas se debe interpretar cuidadosamente, pues es posible que correspondan a contaminación de la muestra con microorganismos de la orofaringe [25].

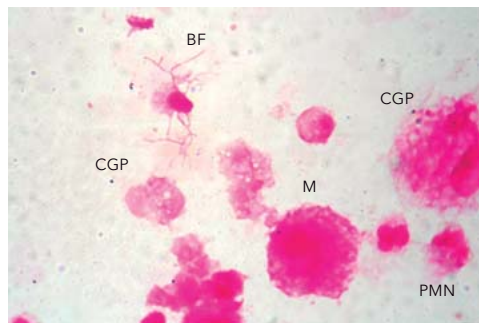


Figura 3. Tinción de Gram de muestra de LBA (100x). En el campo se observan macrófagos (M), neutrófilos (PMN), bacterias filamentosas (BF) y cocos Gram positivos (CGP). Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

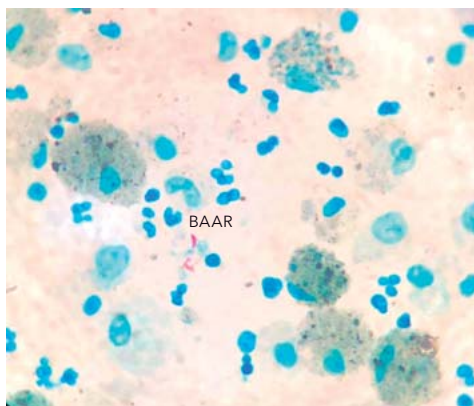


Figura 4. Coloración de Ziehl Neelsen de LBA (100x). Se observan las células del LBA y BAAR atípicas. Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

En el Gram del LBA se debe reportar la cantidad de bacterias observadas como escasa, moderada o abundante, no se cuantifican los leucocitos, pues en contraste a otras muestras como el esputo, su presencia no indica reacción inflamatoria. Lo normal es que haya macrófagos alveolares en el LBA, sin embargo, algunos autores han reportado aumento en el porcentaje de neutrófilos al hacer el recuento diferencial, asociado a las neumonías bacterianas [24].

Tinción de Ziehl Neelsen

La coloración de Ziehl Neelsen (ZN) es una tinción diferencial que permite visualizar bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR), teñidas de color rojo en un fondo azul, gracias a la reacción química de los ácidos micólicos de las BAAR y de la fucsina básica (**figura 4**) [26]. Esta es una característica de los complejos taxonómicos *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*, patógenos pulmonares y extrapulmonares en pacientes inmunosuprimidos [27].

La tinción de ZN se emplea para hacer el diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TB), y en el LBA tiene un rendimiento

diagnóstico mayor que en otras muestras respiratorias, en especial en pacientes cuyo cuadro clínico es muy sugestivo de tuberculosis, pero no expectoran [28,29]. Su utilidad se extiende al seguimiento microbiológico de los pacientes que reciben tratamiento para la tuberculosis y, si bien es una prueba de bajo costo, rápida ejecución y que brinda resultados en pocas horas, está siendo reemplazada por técnicas de biología molecular como la RT-PCR (del inglés, *Real Time Polymerase Chain Reaction*), pues su rendimiento depende de la concentración de bacilos en la muestra (>10.000 micobacterias por mL) y de la experticia del observador; aspectos que influyen en la baja sensibilidad reportada para el ZN (entre el 45% y el 80%), en comparación con el cultivo (entre el 70% y el 90%) [30], y algunas pruebas de RT-PCR que se acercan al 100% [31].

Tinción de Ziehl Neelsen modificado

También conocida como tinción de Kinyoun modificada (cambia el alcohol ácido por ácido sulfúrico al 1%), permite visualizar de color rojo las bacterias que

son parcialmente ácido-alcohol resistentes, entre las cuales se encuentra *Nocardia* spp. (**figura 5**). Esta coloración se hace para confirmar el diagnóstico de nocardiosis pulmonar cuando hay sospecha clínica, o se visualizan sus formas filamentosas en el Gram o en el ZN. Esta patología cursa con un cuadro clínico inespecífico, que afecta a pacientes con inmunosupresión severa y llega a causar neumonía necrotizante grave; de ahí la importancia y oportunidad de utilizar el ZN modificado en el LBA [32,33].

Giemsa-Wright-RAL

Estas tres coloraciones emplean reactivos que tiñen diferencialmente el contenido básico y ácido de las células, permitiendo obtener una gama de colores en las estructuras celulares, que permite diferenciar por la composición química, el citoplasma y el núcleo. Por lo tanto, uno de sus usos es el recuento celular relativo del LBA (**figura 6**), y el otro es detectar hongos como las levaduras intracelulares de *Histoplasma capsulatum* con su característica retracción del núcleo (**figura 7**) [34-36], las formas tróficas de “panal de abejas”

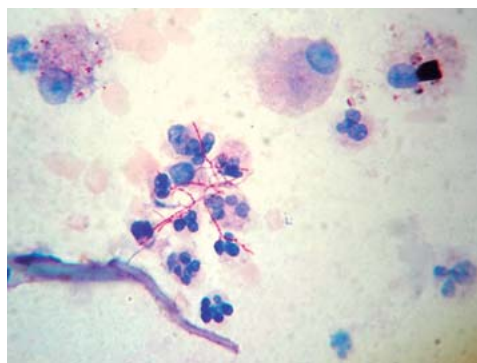


Figura 5. Ziehl Neelsen modificado (100x). Se observan los filamentos de color rojo característicos de *Nocardia* spp. y células propias del LBA. Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

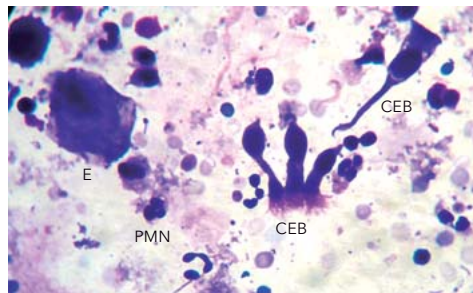


Figura 6. Celularidad en LBA con coloración de Wright (100x). Se observan las células epiteliales escamosas (E) del epitelio bronquial (CEB), y neutrófilos (PMN). Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

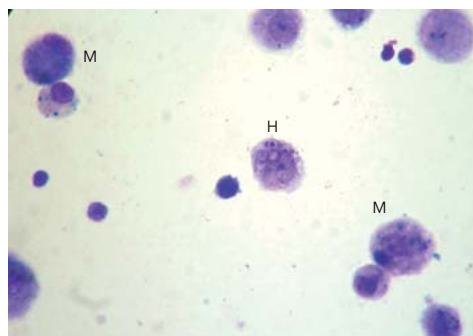


Figura 7. Coloración de Wright (100x) con levaduras intracelulares de *H. capsulatum* (H) y macrófagos alveolares (M). Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

de *Pneumocystis jirovecii*, y en algunas ocasiones permite visualizar hifas o levaduras extracelulares de *C. neoformas* o *Candida* spp. Estos hongos hacen parte del diagnóstico diferencial del cuadro infeccioso pulmonar en pacientes inmunosuprimidos [37].

Plata metenamina de Gomori-Grocott y azul de toluidina (TBO)

Estas tinciones en muestras de LBA, se usan para visualizar estructuras fúngicas como parte del estudio diagnóstico en cuadros respiratorios bajos de pa-

cientes con neoplasias hematológicas, trasplantados, o inmunosuprimidos por causa primaria o secundaria. Los reactivos empleados en la coloración de plata metenamina tiñen los hongos al oxidar los polisacáridos de la pared celular y se convierten en aldehídos que reaccionan con la plata, y adquieren tonalidad café o negra [38]. Esta tinción es inespecífica al unirse a las paredes de todos los hongos, así que la diferenciación de las estructuras fúngicas y de los tipos de levadura propios de cada hongo, depende del buen entrenamiento del microscopista. Por ejemplo, en presencia de *H. capsulatum*, se observan levaduras pequeñas de color marrón oscuro, por la precipitación de los iones de plata de la plata metenamina [39,40]; también se facilita la observación de las hifas hialinas, septadas, con ramificación dicotómica en ángulo de 45° de *Aspergillus* spp. [41].

Por otra parte, el TBO es una coloración metacromática que tiñe los proteoglicanos de la pared de las levaduras y hongos, además, es más fácil de realizar que la plata metenamina y posee una sensibilidad similar a la de la inmunofluorescencia. Se usa principalmente para *P. jirovecii* donde tiñe los esporoquistes, cuya apariencia es de gránulos, de tonalidad azul-lila, ovalados, con una hendidura central, que se agrupan en forma de panal [42] (**figura 8**), pero también se pueden observar otras levaduras como las multigemantes de *P. braziliensis*, y levaduras unigemantes polimórficas y de doble pared de *C. neoformans* (**figura 9**), por lo cual su rendimiento diagnóstico también recae en la experticia del laboratorio que la realiza.

Papanicolaou

La tinción de Papanicolaou en el LBA se emplea para buscar efectos citopáticos causados por virus como los herpes

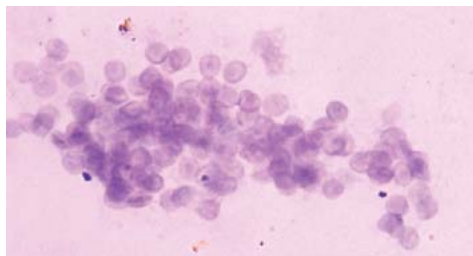


Figura 8. Estructuras fúngicas en coloración de TBO correspondientes a esporoquistes de *P. jirovecii* (100x). Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

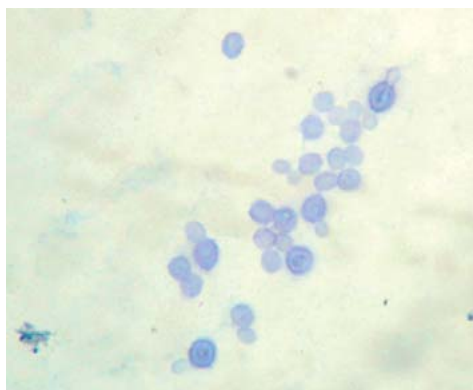


Figura 9. Estructuras fúngicas en coloración de TBO correspondientes a levaduras capsuladas de *C. neoformans* (100x). Fuente: GRIPE, Universidad de Antioquia.

simplex (VHS). Adicionalmente, se ha utilizado para el diagnóstico de infecciones por hongos como *Pneumocystis jirovecii* y especies de *Aspergillus* [27]. Esta tinción también permite distinguir los componentes acidófilos y basófilos de las células, además de evidenciar un patrón de cromatina detallado, ya que tiñe el citoplasma de las células metabólicamente activas [43].

Cultivo

El desarrollo de neumonía depende tanto de la virulencia del germen, como

del sistema inmune del huésped. En la neumonía bacteriana clínicamente manifiesta, la concentración de bacterias debe ser al menos de 10^4 UFC/g de tejido o 10^5 UFC/mL de exudado respiratorio. El cultivo cuantitativo tiene como objetivo diferenciar las bacterias de la microbiota orofaríngea que contaminan la muestra y que están presentes en menor cantidad (concentraciones inferiores a 10^4 UFC/mL), de las bacterias potencialmente patógenas presentes en concentraciones superiores (10^5 UFC/mL a 10^6 UFC/mL). En el estudio diagnóstico de la NAV por LBA, el punto de corte es el recuento bacteriano igual o superior a 10^4 UFC/mL, cuya sensibilidad es del 42% al 93% (media de 73%) y la especificidad del 45% al 100% (media del 82%). Los resultados varían según la población estudiada, el uso previo de antibióticos, el estado inicial del paciente, etc. [16].

Ante la sospecha de infección por *M. tuberculosis* complex (MTC), o en la toma de muestras de LBA en pacientes con inmunosupresión de cualquier origen, se debe hacer cultivo de MTC asociado a una prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección e identificación de la micobacteria y la detección simultánea de genes de resistencia a fármacos empleados en la terapia para la tuberculosis inicial (rifampicina e isoniazida); esta última disminuye notablemente el tiempo de respuesta de 8 semanas a días u horas, y mejora la sensibilidad diagnóstica [30].

El procesamiento de muestras de LBA para diagnóstico de aspergilosis pulmonar incluye la concentración de la muestra, y posterior siembra del sedimento en agar Sabouraud dextrosa, infusión cerebro-corazón (BHI) y agar PDA con gentamicina y cloranfenicol. La incubación se debe hacer a dos temperaturas, 30 °C y 37 °C, mínimo por 72 horas [44]. La identificación del

género es indispensable, y se apoya en las características macroscópicas de las colonias, el aspecto morfológico de las cabezas conidiales [45], la prueba de termotolerancia a 50 °C, o en técnicas de espectrometría de masas como el MALDI-TOF. La detección y cuantificación de galactomanano, un antígeno de pared celular específico de las especies de *Aspergillus* spp. en suero o LBA, es útil para el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasiva [46].

Técnicas inmunológicas

Detección de antígenos y anticuerpos

La detección de antígenos o anticuerpos puede hacerse por diferentes métodos, como la inmunofluorescencia, la inmunocromatografía y las técnicas inmunoenzimáticas. En la inmunofluorescencia se evalúa la presencia de antígenos en tejidos o células, gracias a la combinación de anticuerpos específicos marcados con sondas fluorescentes o fluoróforos. En muestras de LBA, la inmunofluorescencia ha demostrado tener utilidad en el diagnóstico de infecciones por virus respiratorios, *Pneumocystis jirovecii* (**figura 10**) [47], *Legionella* spp. [48], micobacterias atípicas, especies de *Aspergillus* [49] y citomegalovirus [50], entre otros. Por su parte, las técnicas inmunoenzimáticas son de particular utilidad para el diagnóstico de histoplasmosis y aspergilosis en pacientes inmunocomprometidos [51,52].

La inmunocromatografía (ICT) también permite la búsqueda de antígenos o anticuerpos, mediante el uso de una membrana de nitrocelulosa donde ocurre la reacción antígeno-anticuerpo por capilaridad. Se usa en muestras de LBA para buscar infecciones por bacterias como *Streptococcus pneumoniae* [53] o en aspergilosis [54].

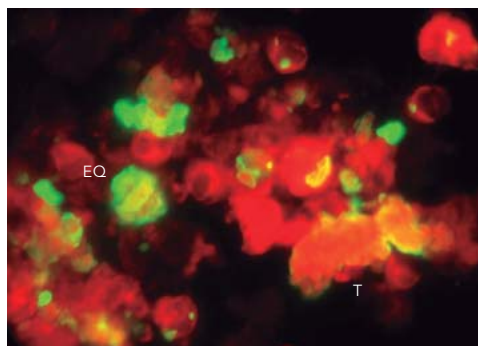


Figura 10. Inmunofluorescencia directa donde se observan las formas tróficas (T) y esporoquistes (EQ) de *P. jirovecii* de color verde, sobre un fondo rojo correspondiente a las células del LBA (100x). Fuente: GRPE, Universidad de Antioquia.

Citometría de flujo

Es un método cuantitativo utilizado en inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular, que permite el estudio de características fenotípicas de las células, como la granularidad, el tamaño y la expresión de receptores específicos de membrana, mediante el uso de marcadores fluorescentes que se unen a las células, permitiendo diferenciar subpoblaciones [55,56].

En el LBA, la citometría de flujo permite la detección de microorganismos (bacterias, virus y hongos), al igual que su respuesta a los diferentes fármacos y citotoxicidad. Además, ha demostrado utilidad en la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos, como los CD8+ y CD4+ en pacientes que padecen ciertas infecciones. Es útil en el diagnóstico y seguimiento de algunos pacientes, como ocurre en las personas infectadas con el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) [57], y recientemente en los infectados con el SARS-CoV-2 (COVID-19), en quienes recuentos muy

bajos de estas células se asocian con incremento en la morbimortalidad [58].

Técnicas de biología molecular

Técnicas de ADN

La PCR, junto con otras técnicas utilizadas en microbiología, como la PCR acoplada a espectrometría de masas (PCR/ESI-MS), han cobrado mucha importancia en la identificación rápida de agentes infecciosos en el LBA [59,60], especialmente en pacientes inmunocomprometidos que están expuestos a infecciones por una variedad amplia de microorganismos, que no exhiben signos y síntomas comunes, y en quienes el inicio de la terapia antimicrobiana adecuada es vital.

Las técnicas de PCR tienen ventajas importantes frente a los cultivos y otros métodos diagnósticos convencionales, como su mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, y su rapidez, ya que no siempre se requiere esperar a que el microorganismo se reproduzca; también, la facilidad que ofrece la PCR multiplex para detectar varios microorganismos en una sola corrida, que pueden ser de diferente género, o de cuantificar la carga viral cuando se requiera mediante una PCR en tiempo real o qPCR. Su principal desventaja frente al cultivo tradicional es que, debido a su fundamento, no se puede determinar la expresión fenotípica de genes de resistencia bacteriana o fúngica que los microorganismos pueden portar, pero no siempre expresar [61].

Actualmente, aunque en pocos laboratorios de diagnóstico clínico, se dispone de la secuenciación del genoma completo de los agentes infecciosos en el LBA; técnica que se usa en el diagnóstico, control y tratamiento de infecciones

fúngicas, bacterianas y virales, en pacientes críticos con o sin deficiencia inmune [62,63]. Incluso, se han hecho estudios empleando la técnica de secuenciación en *shotgun* del microbioma pulmonar, en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas y en receptores de trasplantes pulmonares [51,64,65].

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) realizada en muestras de LBA para identificar el SARS-CoV-2, se considera muy precisa, y se recomienda si es realizada por un operador experto, ya que implica un mayor riesgo de exposición [66]. En casos de hisopados nasofaríngeos negativos en pacientes

con COVID-19, el LBA puede confirmar este diagnóstico, no obstante, se sabe que su identificación depende de la concentración del virus en la muestra [67].

En la **tabla 1** se describen los principales agentes infecciosos que es posible identificar con técnicas de diagnóstico molecular, en muestras de LBA.

Determinación del microbioma pulmonar en el LBA

El sistema respiratorio no es un sitio anatómico estéril, allí se encuentran una amplia variedad de microorganismos encargados de mantener el balan-

Tabla 1. Diagnóstico molecular de agentes infecciosos en muestras de lavado broncoalveolar (LBA)

Agente	Detección del microorganismo	Técnica diagnóstica	Algunos estuches comerciales
Virus			
Adenovirus	La qPCR tiene alta especificidad y sensibilidad, pero cualquier técnica de PCR es diagnóstica [68]	qPCR qRT-PCR multiplex	Adenovirus R-GENE® BioMérieux BioFire® FilmArray®
Coronavirus MERS-CoV	Detección por PCR. Muestras de LBA tienden a tener mayor carga viral que las muestras de esputo e hisopados nasofaríngeos [69]	RT-qPCR qRT-PCR multiplex	RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 BioMérieux BioFire® FilmArray®
Coronavirus SARS-CoV-2	El LBA no es de rutina, y se hace en pacientes con infección severa e intubación orotraqueal. La evaluación de las poblaciones celulares es un indicador de la severidad de la enfermedad [67]	RT-PCR qPCR multiplex	TaqPath RT-PCR COVID-19 Kit® BioMérieux BioFire® FilmArray®
Influenza A-B	El LBA es útil cuando el resultado es indeterminado en muestras respiratorias superiores, además, se puede identificar el subtipo [70]	qRT-PCR multiplex	GeneProof® Flu Multiplex PCR Kit BioMérieux BioFire® FilmArray®
Virus respiratorio sincitial	Su detección hace el diagnóstico, pero cargas virales bajas pueden ser falsos positivos [71]	qRT-PCR multiplex	BioMérieux BioFire® FilmArray® Cepheid Xpert® Flu/ RSV XC y Xpert® Xpress Flu/RSV

Continúa

Herpes simplex (HSV-1)	Las cargas virales altas en LBA se asocian con un aumento de mortalidad en pacientes que llevan más de 14 días en UCI [72]	qPCR	HSV1, HSV2, VZV R-gene®
Citomegalovirus (CMV)	Se cuantifica la carga viral en plasma por qPCR para el diagnóstico. En muestras respiratorias no se hace de rutina, ya que para demostrar que la replicación del CMV es a nivel pulmonar, la carga viral en el LBA debe ser superior a la carga obtenida en lavados faríngeos [73], pero su presencia en LBA parece ser un factor predictor de neumonía por CMV [74]	qPCR	
Bacterias			
<i>Legionella</i> spp.	Detección por PCR del gen 16S [48]	qPCR	BIO-RAD® iQ-Check® <i>Legionella</i> Real-Time
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Amplificación y detección por PCR de los genes del sistema de la fosfotransferasa I, la citoadhesina P1 y el elemento repetitivo RepMP1 [75]. Hay poca correlación entre la serología y la PCR debido a la falta de especificidad de las pruebas inmunológicas [76]	qPCR qRT-PCR multiplex	GeneProof® <i>Mycoplasma pneumoniae</i> PCR Kit, Seeplex® PneumoBacter ACE Detection BioMérieux BioFire® FilmArray®
<i>Chlamydomphyla pneumoniae</i>	El uso en conjunto de la determinación de IgM con el resultado de la PCR es la forma más sensible de diagnosticar la infección en niños [77]	qPCR qRT-PCR multiplex	GeneProof® <i>Chlamydia pneumoniae</i> PCR Kit, Seeplex® PneumoBacter ACE Detection, BioMérieux BioFire® FilmArray®
<i>Bordetella pertusis</i>	Su detección aumenta con la PCR, evitando tratamientos innecesarios, en especial en niños menores de 3 meses [78]	PCR multiplex qRT-PCR multiplex	Seeplex® PneumoBacter ACE Detection BioMérieux BioFire® FilmArray®
<i>Streptococcus pneumoinae</i>	La identificación de la especie puede hacerse por técnicas de MALDI-TOF MS. La PCR detecta la presencia de la bacteria, pero no es posible diferenciar si es colonizante o patógena, por lo que se ha retirado de algunos estuches comerciales. Hay sistemas para diferenciar los subtipos	PCR multiplex MALDI-TOF MS	BioMérieux BioFire® FilmArray® Bruker MALDI Biotyper™ VITEK® MS

Continúa

<i>Staphylococcus aureus</i>	La identificación de la especie puede hacerse por técnicas de MALDI-TOF MS. Se usa PCR para detectar el género y la presencia de genes asociados a perfiles de resistencia	PCR MALDI-TOF MS	Cepheid® Bruker MALDI Biotyper™ VITEK® MS
Micobacterias			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	La identificación de la especie puede hacerse por técnicas de MALDI-TOF MS. La detección por PCR se usa cuando las tinciones son negativas y paucibacilares, y permite diferenciar entre algunas especies, así como detectar genes de resistencia al tratamiento de primera línea [79]	qPCR MALDI-TOF MS	Xpert® MTB/RIF Seegene® Anyplex™ Bruker MALDI Biotyper™ VITEK® MS
Micobacterias no tuberculosas	La identificación de la especie puede hacerse por técnicas de MALDI-TOF MS. Detección por qPCR del gen <i>16S</i> [80]	qPCR MALDI-TOF MS	Ezplex™ MTBC/NTM Real-time PCR Kit Bruker MALDI Biotyper™ VITEK® MS
Hongos			
<i>Aspergillus</i> spp.	La identificación puede hacerse por técnicas de MALDI-TOF MS y PCR a partir de cultivos de secreciones respiratorias [81]. La secuenciación del genoma completo en muestras de LBA es útil [62]	qPCR multiplex MALDI-TOF MS	AsperGenius® Species Multiplex y Resistance Multiplex Kit Bruker MALDI Biotyper™ VITEK® MS
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	La detección se realiza por qPCR, sin embargo, no diferencia entre pacientes infectados y colonizados. Se recomienda acompañar estas pruebas con estudios adicionales [82]	qPCR PCR anidada	RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR Kit 1.0
<i>Histoplasma capsulatum</i>	La identificación puede hacerse por técnicas de MALDI-TOF MS. La mayoría de métodos para la detección molecular de <i>Histoplasma</i> son <i>In House</i> , no hay disponibilidad de kits comerciales [83]. La PCR anidada permite obtener resultados más oportunos y confiables, con una especificidad del 90% al 100%, y una sensibilidad del 100% en muestras embebidas en parafina [40]	PCR anidada PCR multiplex PCR semi anidada PCR convencional	Bruker MALDI Biotyper™ VITEK® MS

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR: PCR con transcripción inversa; qPCR: PCR en tiempo real; MALDI-TOF MS: (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*, en español, desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo).

ce fisiológico del huésped, ayudan a absorber nutrientes, degradan moléculas tóxicas, regulan el sistema inmune y ayudan a resistir patógenos, generando competencia de nutrientes y espacio, dificultando su establecimiento y, por lo tanto, sus procesos infecciosos [1,84].

Las técnicas de metagenómica implican el uso de ácidos nucleicos obtenidos de LBA para secuenciamiento, con técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés, *Next Generation Sequencing*) y análisis bioinformáticos especializados, con el fin de conocer las poblaciones de microorganismos (microbioma) o el perfil de expresión génica del paciente (exoma) [85], y determinar el papel que juegan estas comunidades en el proceso de salud y enfermedad [2,86].

Hay estudios de microbioma pulmonar en diferentes contextos clínicos para comprender la ecología microbiana presente allí. Uno de los fenómenos descritos es la disbiosis en enfermedades como el cáncer y en la infección por VIH. En el primer caso, la disbiosis se ocasiona por el aumento de las poblaciones de *Veillonella* spp. y *Megasphaera* spp. en pacientes con cáncer pulmonar [4,87]; y en el segundo caso, se ha encontrado anellovirus en alta cantidad, relacionado con disbiosis en los pacientes infectados por VIH [64].

Determinación del transcriptoma pulmonar en el LBA

El transcriptoma engloba tanto el conjunto de fragmentos de ARN mensajero que se traducirá posteriormente en proteínas, así como el ARN no codificante que no se traduce. Si bien todas las células somáticas poseen una secuencia de ADN idéntica, se distinguen en que expresan genes diferentes, y por lo tanto, sintetizan

proteínas diferentes, dotándolas del llamado perfil de expresión genética. Mediante este tipo de análisis se puede determinar qué clase de citoquinas expresan los leucocitos en procesos idiopáticos como en infecciones, y de esta manera conocer la respuesta inmune que se lleva a cabo y sus posteriores consecuencias. Por ejemplo, en el estudio de Gao y colaboradores [88] encontraron que, en la infección por *Mycoplasma pneumoniae* en niños, se da la proliferación de células NK y linfocitos CD8+, sentando las bases para posteriores estudios que permitan esclarecer el rol del sistema inmune en esta infección.

Conclusión

El LBA continúa siendo una muestra de gran importancia en el diagnóstico de infecciones respiratorias bajas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en ventilación mecánica. En el análisis es importante valorar la composición celular, microbiológica y bioquímica, para mejorar la aproximación diagnóstica y definir de manera oportuna el tratamiento. Con el desarrollo de pruebas adicionales a las tinciones y cultivo, como son la inmunofluorescencia y las técnicas moleculares, la muestra de LBA para el diagnóstico de enfermedades infecciosas ha tenido un progreso notable en los últimos años, que ha permitido llegar a un diagnóstico certero, o en el peor de los casos, ha contribuido a orientar en el diagnóstico diferencial; además, algunas de estas pruebas permiten detectar el género y especie del agente etiológico, así como la presencia de genes asociados a perfiles de resistencia. No obstante, se debe tener presente que los resultados siempre deben interpretarse a la luz del contexto clínico del paciente.

Referencias

1. **Patel PH, Antoine M, Ullah S.** Bronchoalveolar lavage. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Acceso 11 de abril de 2021. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430762/>.
2. **Escribano-Montaner A, Moreno-Galdó A.** Técnicas fibrobronoscópicas especiales: lavado broncoalveolar, biopsia bronquial y biopsia transbronquial. *An Pediatr* 2005;62:352-366. <https://doi.org/10.1157/13073249>.
3. **Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Pierre J, Darne C, et al.** Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:877-884. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/139.4.877>.
4. **Michavila IA, Núñez NR, Alvarez JL, Sánchez MM.** Broncoscopia. Técnicas diagnósticas. In: Soto Campos G, ed. *Manual de Diagnóstico y Terapéutica en Neumología*. 1a ed. Madrid, España: Asociación de Neumología y Cirugía Torácica del Sur (NEMOSUR); 2005. p. 113-124.
5. **Cacho-Calvo JB, Meseguer-Peinado MA, Oliver-Palomo A, Puig-de la Bellacasa J.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. Madrid, España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2007. Acceso 15 de marzo de 2021. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia25.pdf>.
6. **Fernández-Bussy S, Labarca G, Zagolin M, Oyonarte M, Isamit D, Jalilie A, et al.** Complicaciones asociadas a la broncoscopia flexible: análisis de registro post-procedimiento. *Rev Méd Chile* 2014;142:299-304.
7. **Terkawi RS, Altirkawi KA, Terkawi AS, Mukhtar G, Al-Shamrani A.** Flexible bronchoscopy in children: Utility and complications. *Int J Pediatr Adolesc Med* 2016;3:18-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2015.12.003>.
8. **Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al.** A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by The Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* 2018;67:e1-e94. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>.
9. **Sánchez-Romero MI, García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N.** Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019;37:127-134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>.
10. **Somoza N, Torà M.** Seguridad biológica en la preservación y el transporte de muestras biológicas obtenidas en el ámbito de las enfermedades respiratorias y destinadas a la investigación. *Arch Bronconeumol* 2009;45:187-195. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.02.001>.
11. **Bergner LM, Orton RJ, da Silva Filipe A, Shaw AE, Becker DJ, Tello C, et al.** Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Mol Ecol Resour* 2019;19:128-143. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946>.
12. **Chamberlain DW, Braude AC, Rebeck AS.** A critical evaluation of bronchoalveolar lavage. Criteria for identifying unsatisfactory specimens. *Acta Cytol* 1987;31:599-605.
13. **Ettensohn 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. <https://doi.org/10.1378/chest.94.2.275>.
14. **Davis GS, Giancola MS, Costanza MC, Low RB.** Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:611-616.
15. **Thomson RB, Jr.** Laboratory diagnosis of respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis* 1999;12:115-119. <https://doi.org/10.1097/00001432-199904000-00002>.
16. **Jourdain B, Joly-Guillou ML, Dombret MC, Calvat S, Trouillet JL, Gibert C, et al.** Usefulness of quantitative cultures of BAL fluid for diagnosing nosocomial pneumonia in ventilated patients. *Chest* 1997;111:411-418. <https://doi.org/10.1378/chest.111.2.411>.
17. **Meduri GU, Baselski V.** The role of bronchoalveolar lavage in diagnosing nonopportunistic

- bacterial pneumonia. *Chest* 1991;100:179-190. <https://doi.org/10.1378/chest.100.1.179>.
18. **Castella J, Ancochea J, Llorente L, Puzo C, Sanchez J, Sueiro A, et al.** Lavado broncoalveolar. *Arch Bronconeumol* 1997;33:515-526. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(15\)30534-2](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(15)30534-2).
 19. **Norman FF, Chamorro S, Braojos F, López-Miranda E, Chamorro J, González I, et al.** *Strongyloides* in bronchoalveolar lavage fluid: Practical implications in the COVID-19 era. *J Travel Med* 2021. <https://doi.org/10.1093/jtm/taab114>.
 20. **Fischer PU, Weil GJ.** North American paragonimiasis: epidemiology and diagnostic strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;13:779-786. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1031745>.
 21. **González Á, Tobón ÁM.** Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. *Infectio* 2006;10:279-287.
 22. **Decré D, Barbut F, Petit JC.** [Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of nosocomial diarrhea]. *Pathol Biol (Paris)* 2000;48:733-744.
 23. **O'Horo JC, Thompson D, Safdar N.** Is the Gram stain useful in the microbiologic diagnosis of VAP? A meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012;55:551-561. <https://doi.org/10.1093/cid/cis512>.
 24. **Rea-Neto A, Youssef NC, Tuche F, Brunkhorst F, Ranieri VM, Reinhart K, et al.** Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a systematic review of the literature. *Crit Care* 2008;12:R56. <https://doi.org/10.1186/cc6877>.
 25. **Papazian L, Klompas M, Luyt CE.** Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med* 2020;46:888-906. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05980-0>.
 26. **Corrales-Ramírez LC, Caycedo-Lozano L.** Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova* 2020;18:73-100. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>.
 27. **Rosati LA, Leslie KO.** 6 - Lung infections. In: Leslie KO, Wick MR, eds. *Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2011. p. 137-211. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5770-3.00006-7>.
 28. **Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, et al.** Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Rep* 2020;47:4065-4075. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05413-7>.
 29. **Ahmad M, Ibrahim WH, Sarafandi SA, Shahzada KS, Ahmed S, Haq IU, et al.** Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in the subset of patients with negative sputum/smear and mycobacterial culture and a suspicion of pulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis* 2019;82:96-101. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.03.021>.
 30. **Rincón-Caballero OL, Cano-Romero MA, Aris-tizábal-Bernal BH.** Diagnóstico de tuberculosis pulmonar en lavado broncoalveolar: desempeño de la PCR en comparación con las pruebas microbiológicas de rutina. *Med Lab* 2017;23:475-484. <https://doi.org/10.36384/01232576.26>.
 31. **Sanabria-Delgado EV.** Evaluación del desempeño de la prueba Xpert Mtb/Rif® para la detección de tuberculosis en un hospital público de Bucaramanga. Bogotá D.C.: Universidad CES; 2018. Acceso 15 de marzo de 2021. Disponible en <http://repository.urosario.edu.co/handle/10336/18047>.
 32. **Trujillo DE, Ortiz S, Pérez O, Cortés CA, Carrillo JA.** Abscesos cerebrales por *Nocardia* spp. en una paciente inmunocompetente. *Biomédica* 2020;40:27-33. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4925>.
 33. **Bautista H, Lizarazo J.** Nocardiosis diseminada en una paciente VIH negativa. A propósito de un caso de difícil tratamiento. *Acta Neurol Colomb* 2015;31:267-273.
 34. **Guarner J, Brandt ME.** Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:247-280. <https://doi.org/10.1128/cmr.00053-10>.
 35. **Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C.** Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:207-227. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009>.
 36. **López CE.** Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. *Rev Argent Microbiol* 2006;38:235-242.
 37. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** *Pneumocystis pneumonia*. Fungal diseases. Atlanta, USA: Centers for Disease Con-

- trol and Prevention; 2020. Acceso 18 de abril de 2021. Disponible en <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/pneumocystis-pneumonia/index.html>.
38. **Rapidmicrobiology.** Gomori's methenamine silver staining kit for fungi detection. Ireland: Rapid Test Methods Ltd, Sigma-Aldrich Corp; 2010. Acceso 13 de abril de 2021. Disponible en <https://www.rapidmicrobiology.com/news/gomoris-methenamine-silver-staining-kit-for-fungi-detection>.
 39. **Muñoz CO, Cano LE, González A.** Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio* 2010;14:s145-s158.
 40. **Maniscalchi-Badaoui MT, Lemus-Espinoza D.** Mecanismos de evasión de *Histoplasma capsulatum* en los fagocitos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2006;26:6-13.
 41. **Cuervo-Maldonado SI, Gómez-Rincón JC, Rivas P, Guevara FO.** Actualización en aspergilosis con énfasis en aspergilosis invasora. *Infectio* 2010;14:131-144. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70131-4](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70131-4).
 42. **Rodiño J, Rincón N, Aguilar YA, Rueda ZV, Herrera M, Vélez LA.** Diagnóstico microscópico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en muestras de lavado broncoalveolar y lavado orofaríngeo de pacientes inmunocomprometidos con neumonía. *Biomedica* 1969;31:222-231. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i2.307>.
 43. **Raju K.** Evolution of Pap Stain. *Biomed Res Ther* 2016;3:6. <https://doi.org/10.7603/s40730-016-0006-8>.
 44. **Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al.** Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24 Suppl 1:e1-e38. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.002>.
 45. **Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Ráčil Z, Richardson M, Rogers TR.** Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 2011;66 Suppl 1:i15-24. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq438>.
 46. **Cruz R.** [Laboratory guidelines for diagnosis of invasive fungal disease caused by filamentous fungi]. *Rev Chilena Infectol* 2014;31:173-179. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182014000200008>.
 47. **Mantadakis E.** *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in children with hematological malignancies: Diagnosis and approaches to management. *J Fungi (Basel)* 2020;6:331. <https://doi.org/10.3390/jof6040331>.
 48. **Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, et al.** Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol* 2001;39:2618-2626. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.7.2618-2626.2001>.
 49. **Fernández-Cruz A, Magira E, Heo ST, Evans S, Tarrand J, Kontoyiannis DP.** Bronchoalveolar lavage fluid cytology in culture-documented invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases: Analysis of 67 episodes. *J Clin Microbiol* 2018;56. <https://doi.org/10.1128/jcm.00962-18>.
 50. **Roży A, Duk K, Szumna B, Skrońska P, Gawryluk D, Chorostowska-Wynimko J.** Effectiveness of PCR and immunofluorescence techniques for detecting human cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage fluid. *Adv Exp Med Biol* 2016;921:21-26. https://doi.org/10.1007/5584_2016_246.
 51. **Davidson KR, Ha DM, Schwarz MI, Chan ED.** Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: a review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. *J Thorac Dis* 2020;12:4991-5019.
 52. **Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA.** *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004;42:5517-5522. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.12.5517-5522.2004>.
 53. **Jacobs JA, Stobberingh EE, Cornelissen EIM, Drent M.** Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in bronchoalveolar lavage fluid samples by a rapid immunochromatographic membrane assay. *J Clin Microbiol* 2005;43:4037-4040. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4037-4040.2005>.

54. **Scharmann U, Verhasselt HL, Kirchoff L, Buer J, Rath PM, Steinmann J, et al.** Evaluation of two lateral flow assays in BAL fluids for the detection of invasive pulmonary aspergillosis: A retrospective two-centre study. *Mycoses* 2020;63:1362-1367. <https://doi.org/10.1111/myc.13176>.
55. **Barrera-Ramírez L, Drago-Serrano M, Pérez-Ramos J, Sainz Espuñes T, Zamora A, Gómez-Arroyo F, et al.** Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:42-55.
56. **McKinnon KM.** Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol* 2018;120:5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
57. **Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M.** Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* 2000;13:167-195. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.167>.
58. **Huang W, Berube J, McNamara M, Sakse-na S, Hartman M, Arshad T, et al.** Lymphocyte subset counts in COVID-19 patients: A meta-analysis. *Cytometry A* 2020;97:772-776. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24172>.
59. **Mok JH, Eom JS, Jo EJ, Kim MH, Lee K, Kim KU, et al.** Clinical utility of rapid pathogen identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in ventilated patients with pneumonia: A pilot study. *Respirology* 2016;21:321-328. <https://doi.org/10.1111/resp.12677>.
60. **Ullberg M, Lüthje P, Mölling P, Strålin K, Özenci V.** Broad-range detection of microorganisms directly from bronchoalveolar lavage specimens by PCR/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *PLoS One* 2017;12:e0170033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170033>.
61. **Ragupathi NKD, Bakthavatchalam YD, Mathur P, Pragasam AK, Walia K, Ohri VC, et al.** Plasmid profiles among some ESKAPE pathogens in a tertiary care centre in south India. *Indian J Med Res* 2019;149:222-231. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2098_17.
62. **Li Y, Sun B, Tang X, Liu YL, He HY, Li XY, et al.** Application of metagenomic next-generation sequencing for bronchoalveolar lavage diagnostics in critically ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020;39:369-374. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03734-5>.
63. **Pendleton KM, Erb-Downward JR, Bao Y, Branton WR, Falkowski NR, Newton DW, et al.** Rapid pathogen identification in bacterial pneumonia using real-time metagenomics. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:1610-1612. <https://doi.org/10.1164/rccm.201703-0537LE>.
64. **Young JC, Chehoud C, Bittinger K, Bailey A, Diamond JM, Cantu E, et al.** Viral metagenomics reveal blooms of anelloviruses in the respiratory tract of lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2015;15:200-209. <https://doi.org/10.1111/ajt.13031>.
65. **Schneeberger PHH, Prescod J, Levy L, Hwang D, Martinu T, Coburn B.** Microbiota analysis optimization for human bronchoalveolar lavage fluid. *Microbiome* 2019;7:141. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0755-x>.
66. **Jahromi R, Avazpour A, Jahromi M, Alavi J.** COVID-19 with positive bronchoalveolar lavage fluid but negative nasopharyngeal and oropharyngeal swabs: A case report and insights. *Indian J Case Reports* 2020;6:380-382. <https://doi.org/10.32677/IJCR.2020.v06.i07.010>.
67. **Baron A, Hachem M, Tran Van Nhieu J, Botterel F, Fourati S, Carreaux G, et al.** Bronchoalveolar lavage in patients with COVID-19 with invasive mechanical ventilation for acute respiratory distress syndrome. *Ann Am Thorac Soc* 2021;18:723-726. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202007-868RL>.
68. **Kadmon G, Levy I, Mandelboim M, Nahum E, Stein J, Dovrat S, et al.** Polymerase-chain-reaction-based diagnosis of viral pulmonary infections in immunocompromised children. *Acta Paediatr* 2013;102:e263-268. <https://doi.org/10.1111/apa.12207>.
69. **Ogimi C, Waghmare AA, Kuypers JM, Xie H, Yeung CC, Leisenring WM, et al.** Clinical significance of human coronavirus in bronchoalveolar lavage samples from hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2017;64:1532-1539. <https://doi.org/10.1093/cid/cix160>.
70. **Bogoch, II, Andrews JR, Zachary KC, Hohmann EL.** Diagnosis of influenza from lower respiratory tract sampling after negative upper respiratory tract sampling. *Virulence* 2013;4:82-84. <https://doi.org/10.4161/viru.22466>.

- 71. Hogan C, Caya C, Papenburg J.** Rapid and simple molecular tests for the detection of respiratory syncytial virus: a review. *Expert Rev Mol Diagn* 2018;18:617-629. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1487293>.
- 72. Linssen CF, Jacobs JA, Stelma FF, van Mook WN, Terporten P, Vink C, et al.** Herpes simplex virus load in bronchoalveolar lavage fluid is related to poor outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2008;34:2202-2209. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1231-4>.
- 73. Kerschner H, Jaksch P, Zweytick B, Puchhammer-Stöckl E.** Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant recipients reflects local virus replication and not contamination from the throat. *J Clin Microbiol* 2010;48:4273-4274. <https://doi.org/10.1128/jcm.01197-10>.
- 74. Gámez SS, Ruiz MP, Navarro Mari JM.** Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32:15-22.
- 75. Schmitt BH, Sloan LM, Patel R.** Real-time PCR detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:202-205. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.016>.
- 76. Patterson C, Lipman M, Mack D, McHugh T.** Who gets a laboratory positive diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*: A 10-year retrospective analysis. *Clin Infect Pract* 2021;10:100070. <https://doi.org/10.1016/j.clinpr.2021.100070>.
- 77. Kumar S, Kashyap B, Kumar S, Kapoor S.** Diagnostic utility of serology and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* in paediatric community-acquired lower respiratory tract infections. *Indian J Med Microbiol* 2020;38:152-156. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_20_145.
- 78. González-Bertolín I, Ochoa-Fernández BM, Bloise I, de Ceano-Vivas-La Calle M, Ruiz-Domínguez JA.** PCR urgente de *Bordetella* en lactantes menores de 3 meses, una herramienta útil en el servicio de urgencias pediátricas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2021;39:174-178. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.04.008>.
- 79. Tso TC, Chen CH, Hong JH, Hsieh MJ, Tsoa KC, Lee CH.** Shifts of T4/T8 T lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 2002;122:1285-1291. <https://doi.org/10.1378/chest.122.4.1285>.
- 80. Perng CL, Chen HY, Chiueh TS, Wang WY, Huang CT, Sun JR.** Identification of non-tuberculous mycobacteria by real-time PCR coupled with a high-resolution melting system. *J Med Microbiol* 2012;61:944-951. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.042424-0>.
- 81. Balajee SA, Marr KA.** Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. *Future Microbiol* 2006;1:435-445. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.4.435>.
- 82. Guegan H, Robert-Gangneux F.** Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2019;32:314-321. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000559>.
- 83. Vasconcellos I, Dalla Lana DF, Pasqualotto AC.** The role of molecular tests in the diagnosis of disseminated histoplasmosis. *J Fungi* 2019;6. <https://doi.org/10.3390/jof6010001>.
- 84. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA.** An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 2007;449:811-818. <https://doi.org/10.1038/nature06245>.
- 85. Leo S, Gaia N, Ruppé E, Emonet S, Girard M, Lazarevic V, et al.** Detection of bacterial pathogens from broncho-alveolar lavage by next-generation sequencing. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18092011>.
- 86. Hahn A, Warnken S, Pérez-Losada M, Freishtat RJ, Crandall KA.** Microbial diversity within the airway microbiome in chronic pediatric lung diseases. *Infect Genet Evol* 2018;63:316-325. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.006>.
- 87. Lee SH, Sung JY, Yong D, Chun J, Kim SY, Song JH, et al.** Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer* 2016;102:89-95. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.10.016>.
- 88. Gao M, Wang K, Yang M, Meng F, Lu R, Zhuang H, et al.** Transcriptome analysis of bronchoalveolar lavage fluid from children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia reveals natural killer and t cell-proliferation responses. *Front Immunol* 2018;9:1403. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01403>.