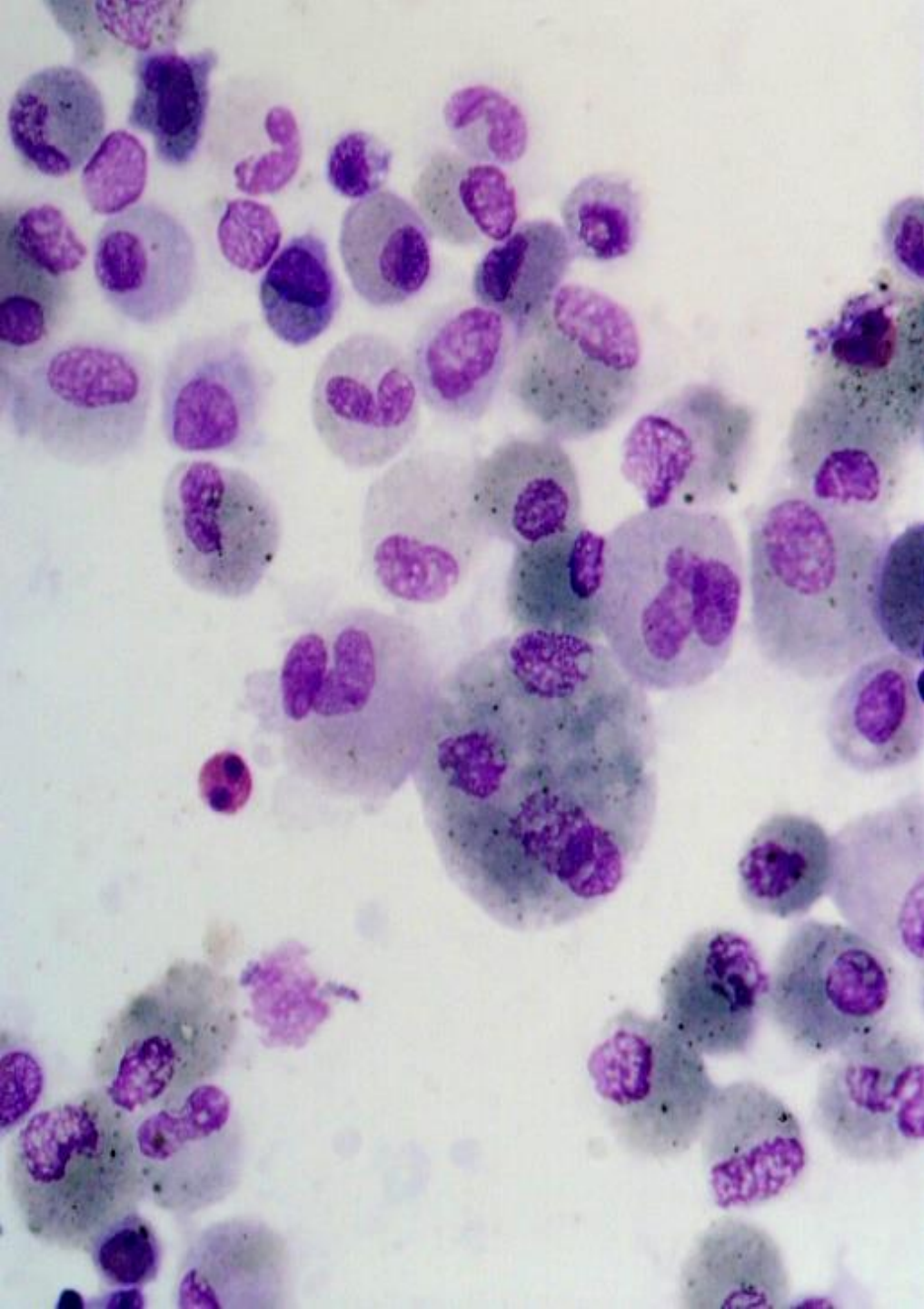




Μελέτη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος

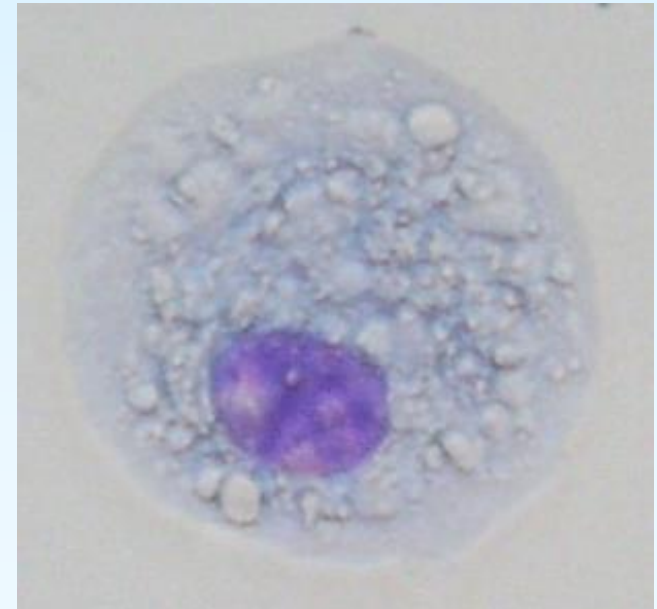
**Όλγα Χατζηζήση
29/4 • 02/05, 2010
Αργοστόλι Κεφαλονιάς**

Τι είναι το BAL

Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage, BAL): το υλικό έκπλυσης συγκεκριμένου βρογχοκυψελιδικού χώρου με φυσιολογικό ορό για διαγνωστικούς και ερευνητικούς λόγους

Τι περιέχει το BAL

- Κύτταρα, που προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό
- Διαλυτά μόρια



Διαλυτά συστατικά στο BAL

Πρωτεΐνη

Αλβουμίνη
Πρωτεΐνες
Ανοσοσφαιρίνες
Χημειοκίνες
Κυτταροκίνες

Πρωτεάσες / Αντιπρωτεάσες / Ένζυμα

Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης
Μεταλλοπρωτεϊνάσες
Ελαστάση
A1-Αντιθρυψίνη

Λιπίδια και μεσολαβητές λιπιδίων

Μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος
Προϊόντα λιποξυγενάσης

Άλλοι διαλυτοί παράγοντες

Συμπλήρωμα
Ισταμίνη
Ηλεκτρολύτες
Παράγοντες πήξης
Αντιοξειδωτικά / Οξειδωτικά

Φάρμακα

Αντιβιοτικά
Εισπνεόμενες φαρμακευτικές ουσίες

Αντιγόνα

Αντιγόνα παθογόνων
Καρκινικά αντιγόνα

Χρησιμότητα της μελέτης του BAL

Διάγνωση:

χρήσιμη μέθοδος για τη διάγνωση διαφόρων νοσημάτων του πνεύμονα, όπως λοιμώξεων, διάμεσων νοσημάτων, κακοηθειών

Έρευνα:

εργαλείο για τη διερεύνηση της ανοσοπαθογένειας των πνευμονικών παθήσεων, επειδή τα ευρήματα από την ανάλυση του BAL συμβάλλουν στην κατανόηση των ανοσιακών και φλεγμονωδών μηχανισμών που επικρατούν σε διάφορα νοσήματα του πνεύμονα

Λήψη του BAL

Βρογχοκυψελική έκπλυση:

ασφαλής, ελάχιστα επεμβατική τεχνική, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης

- Ενσφήνωση του ινοβρογχοσκοπίου στον κατάλληλο βρόγχο (συνήθως δεξιός μέσος λοβός η γλωσσίδα)
- Σταδιακή έγχυση ποσότητας φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας 37°C (4 κλάσματα των 50 ml)
- Αναρρόφηση του εκπλύματος

Σύγκριση με τη βιοψία

Πλεονέκτημα σε σύγκριση με τη βιοψία:

Το δείγμα προέρχεται από μεγαλύτερη περιοχή του παρεγχύματος και έτσι δίνει πιο αντιπροσωπευτική εικόνα της φλεγμονής και των ανοσολογικών διαταραχών του πνεύμονα.

Μειονέκτημα σε σύγκριση με τη βιοψία:

Η βιοψία είναι πιο ειδική

Επεξεργασία του δείγματος

Τα κύρια βήματα για την επεξεργασία του δείγματος είναι:

- Μέτρηση του συνολικού όγκου του αναρροφώμενου εκπλύματος
- Διήθηση του εκπλύματος με αποστειρωμένη – γάζα για την απομάκρυνση της βρογχικής βλέννης, όταν απαιτείται.
- Φυγοκέντρηση του υλικού και λήψη του ιζήματος των κυττάρων.
- Μέτρηση του ολικού αριθμού των κυττάρων και, εάν χρειάζεται, προσαρμογή της συγκέντρωσης σε 10^6 κύτταρα/ml εναιωρήματος, με κατάλληλη αυξομείωση του όγκου.
- Έκπλυση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό (RPMI 1640+25mM Hepes ή άλλο)
- Παρασκευή εναιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (RPMI 1640+25mM Hepes ή άλλο)
- Φυγοκέντρηση μικρής ποσότητας (50-100 μ l) του υλικού σε κυτταροφυγόκεντρο και λήψη παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Χρώση των παρασκευασμάτων με χρωστική May Grunwald-Ciensa
- Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων και προσδιορισμός του κυτταρικού τύπου
- Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων (50-100 μ l του εναιωρήματος κυττάρων για κάθε σωληνάριο)

Κυτταρικός πληθυσμός στο BAL σε υγιή άτομα μη καπνιστές

Κύτταρα / ml x 10 ³	60-270 x 10 ³
Μακροφάγα	80-85%
Λεμφοκύτταρα	5-12%
Ουδετερόφιλα	3-8%
Εωσινόφιλα	0-2%

Costabel U, et al Chest 1986; 90:39-44

Υγιή άτομα καπνιστές:

Αύξηση μακροφάγων και ουδετεροφίλων
Ελάττωση λεμφοκυττάρων
4πλάσια αύξηση ολικού αριθμού κυττάρων

Ηλικιωμένα άτομα

Αύξηση λεμφοκυττάρων και ουδετεροφίλων

Άλλα κύτταρα

Μαστοκύτταρα

Πλασματοκύτταρα

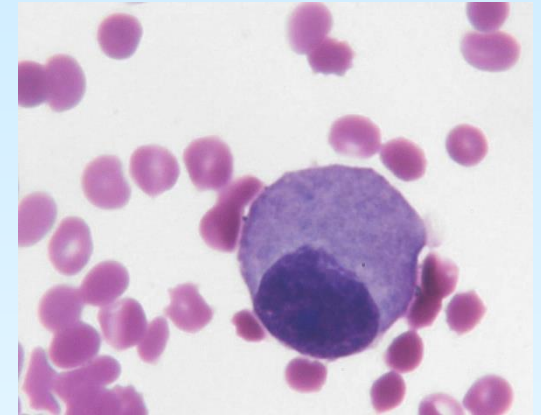
Βασεόφιλα

Ερυθρά

Πνευμονοκύτταρα τύπου I και II



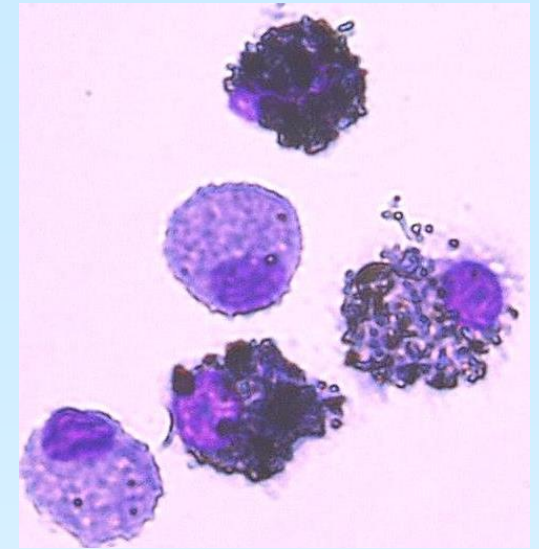
Σπάνια



Επιθηλιακά κύτταρα: πλακώδη και κροσσωτά

Επιθηλιακά κύτταρα βρογχικής προέλευσης: ο αριθμός τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 κύτταρα/100 κύτταρα BAL

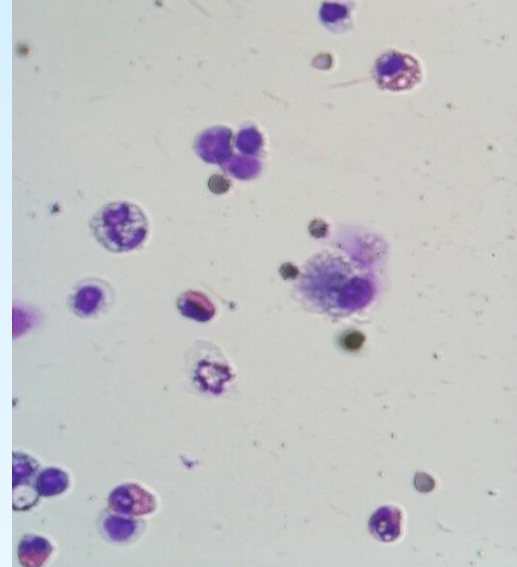
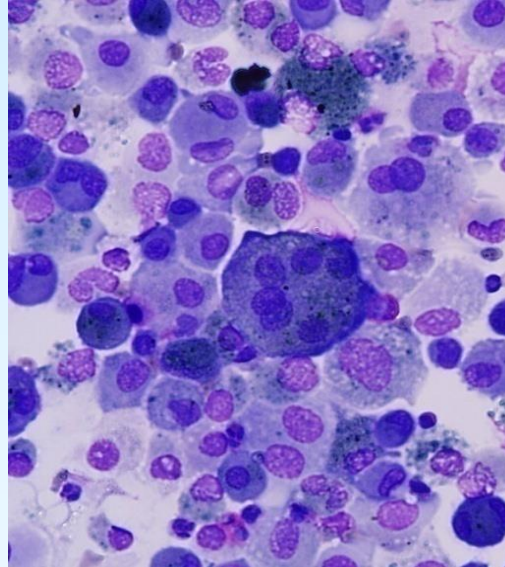
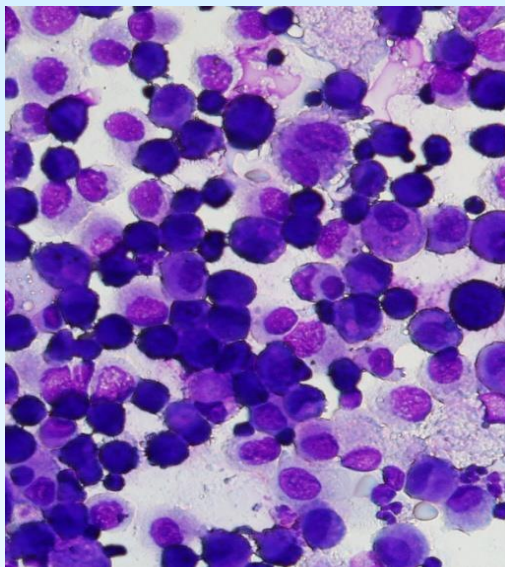
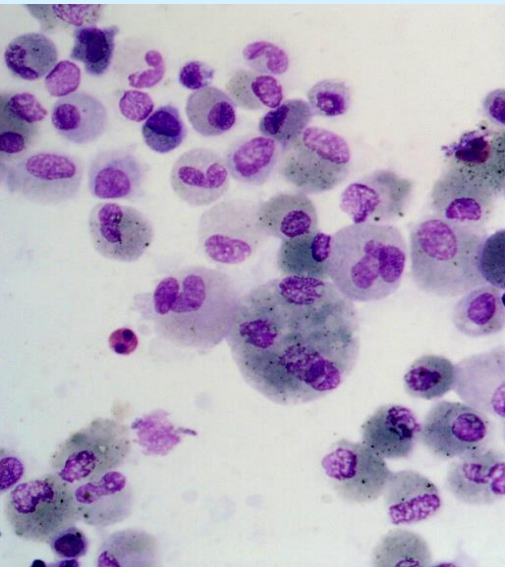
Μακροφάγα



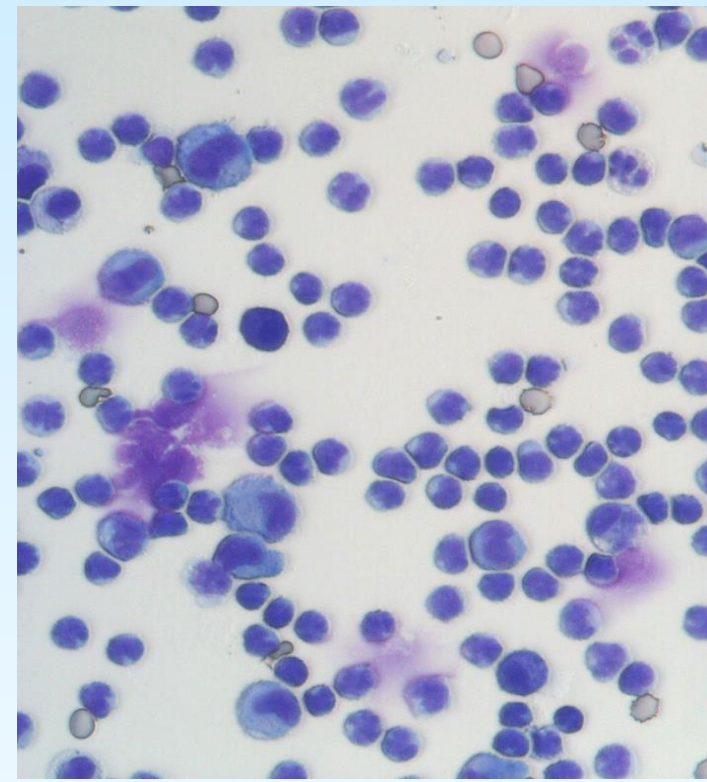
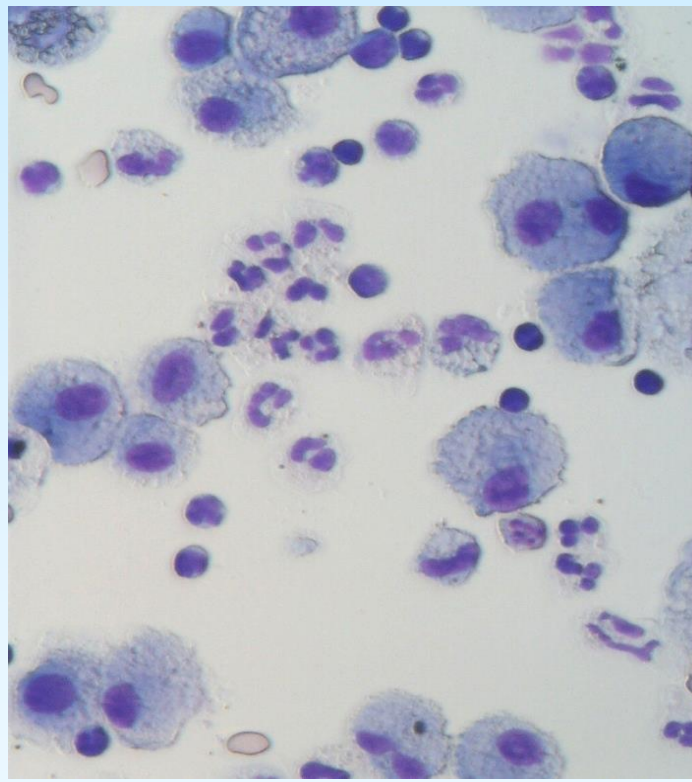
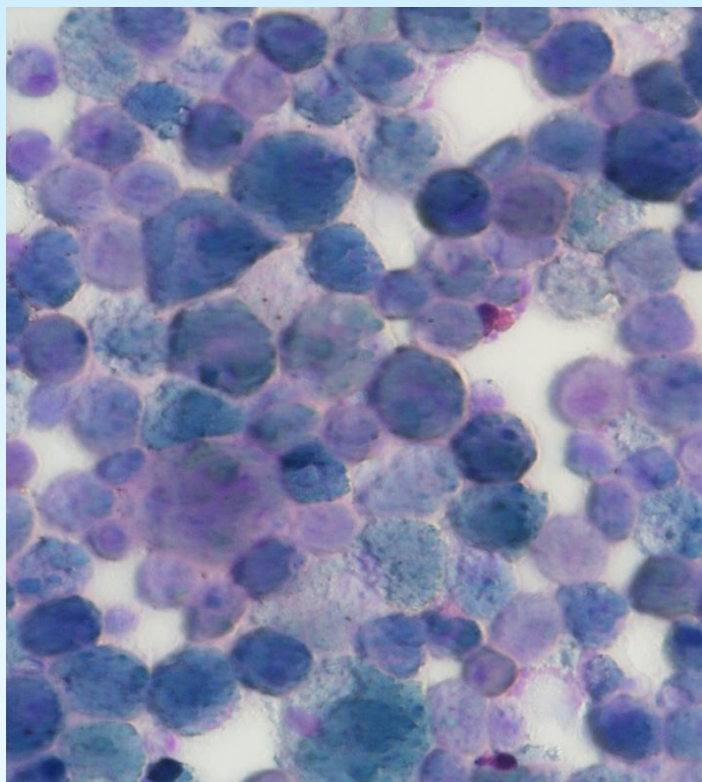
Μικτός κυτταρικός πληθυσμός:

- **ιστικά** (τοπικά) **μακροφάγα** (αεραγωγών, κυψελίδων, διαμέσου χώρου)
- **μεταναστευτικά μακροφάγα** (μονοπύρηνα αίματος)

CELLULARITY ON CYTOSPINS...



... ..**VERY PLEIOMORPHIC**



ESCCA course, St Etienne, September 9, 2009, MC Béné

Ανοσοφαινότυπος λεμφοκυττάρων σε υγιή άτομα

T-κύτταρα: CD3+, 70-90% των λεμφοκυττάρων

B-κύτταρα: CD19+, 0-10% των λεμφοκυττάρων

NK-κύτταρα: CD56+, 1-5%, CD57+, 10% των λεμφοκυττάρων

NKT-κύτταρα: σπανιότατα

Λόγος CD4/CD8: 1,5-2,5

Παράγοντες που επηρεάζουν: κάπνισμα, ηλικία

Καπνιστές: ελάττωση του λόγου CD4/CD8

Ηλικιωμένα άτομα: αύξηση του λόγου CD4/CD8

Η μελέτη του BAL περιλαμβάνει:

Μακροσκοπική εξέταση (όψη):

γαλακτώδες, αιμορραγικό, καφεοειδές, ίζημα

Ανεύρεση παθογόνων:

μικροοργανισμοί, ιοί, μύκητες, pn. carinii

Ευρήματα από τη μελέτη των κυττάρων

Κυτταρικός τύπος

Μορφολογία κυττάρων

Ανοσοφαινότυπος

Νοσήματα στα οποία το BAL αποτελεί χρήσιμη μέθοδο διάγνωσης

Πνευμονική λοίμωξη

Ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς με διηθήσεις
Πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα
Εκτίμηση επίμονων διηθήσεων/ανεπαρκής
απάντηση στη θεραπεία

Πνευμονική κακοήθεια

Λεμφαγγειακή καρκινωμάτωση
Βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα
Άλλες κακοήθειες

Οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια

Διάχυτη διηθητική πνευμονοπάθεια

Κυψελιδική αιμορραγία
Σαρκοείδωση
Κυψελιδική πρωτεΐνωση
Εωσινοφιλική πνευμονία
Φαρμακευτικές πνευμονοπάθειες
Ιστιοκυττάρωση Langerhans
Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία
Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση

Επαγγελματική πνευμονοπάθεια

Βηρυλλίωση – Πυριτίαση – Αμιάντωση
Ασβέστωση – Σιλίκωση

Έλεγχος μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα

Πνευμονοπάθεια παιδιών

Λοίμωξη
Διάμεση πνευμονοπάθεια
Εισρόφηση
Αιμορραγία
Κυστική ίνωση

Διαγνωστική αξία του BAL

Το BAL αποτελεί διαγνωστική εξέταση εκλογής για:

- Κυψελιδική πρωτεΐνωση
- Πνευμονική αιμοσιδήρωση
- Ιστιοκυττάρωση Langerhans

Το BAL αποτελεί συμπληρωματική βοηθητική εξέταση για σημαντικό αριθμό παθήσεων του διάμεσου χώρου του πνεύμονα.

Τύπος κυττάρων στο BAL σε διάφορα νοσήματα

↑ Λεμφοκύτταρα ($\geq 15\%$)

Σαρκοείδωση
Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία
Νοσήματα συνδετικού ιστού
Φαρμακευτική πνευμονίτιδα
Ιδιοπαθής διάμεση πνευμονία (NSIP-
κυτταρική, COP)
Φλεγμονώδης νόσος εντέρου (νόσος Grohn)
Επαγγελματικές παθήσεις (βηρυλλίωση)
Λοίμωξη (φυματίωση, ιογενής)
Μετακτινική πνευμονίτιδα

↑ Ουδετερόφιλα ($\geq 5\%$)

Λοίμωξη
Τραυματισμός πνευμονικού παρεγχύματος
Ιδιοπαθής διάμεση πνευμονία (COP, DIP,
IPF, NSIP)
Νοσήματα συνδετικού ιστού
Φαρμακευτική πνευμονίτιδα
Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία
Επαγγελματικές παθήσεις του πνεύμονα
Πνευμονία από εισρόφηση
Σαρκοείδωση

↑ Εωσινόφιλα ($\geq 3\%$)

Εωσινοφιλική πνευμονία
Φαρμακευτική πνευμονίτιδα
Σύνδρομο Churg-strauss
Υπερεωσινοφιλικό σύνδρομο
Παρασιτικές λοιμώξεις
Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, ινώδης NSIP
Νοσήματα συνδετικού ιστού
Πνευμονία από Pn. Carinii

↑ Πλασματοκύτταρα

Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία
Φαρμακευτική πνευμονίτιδα
Εωσινοφιλική πνευμονία
Κακοήθη νοσήματα
Λοίμωξη (Legionella, Pn. Carinii)

↑ Μαστοκύτταρα

Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία
Φαρμακευτική πνευμονίτιδα
Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση
Νοσήματα συνδετικού ιστού
Κρυπτογενής οργανοποιός πνευμονία
Εωσινοφιλική πνευμονία
Κακοήθη νοσήματα
Σαρκοείδωση

Διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου

Τα νοσήματα με λεμφοκυτταρικό τύπο διακρίνονται:

Νοσήματα με λόγο CD4/CD8



αυξημένο

φυσιολογικό

ελαττωμένο

Ούτε ο αριθμός των λεμφοκυττάρων, ούτε ο λόγος CD4/CD8 αποτελούν ειδικά ευρήματα χαρακτηριστικά των πνευμονικών παθήσεων.

Διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου

Νοσήματα με CD4-λεμφοκυττάρωση:

- Σαρκοείδωση
- Βηρυλλίωση
- Ασβέστωση
- Ρευματοειδής αρθρίτις
- Νόσος Crohn

Διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου

Νοσήματα με CD8-λεμφοκυττάρωση:

- Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία (υποξεία φάση)
- Κρυπτογενής οργανοποιός πνευμονία (βρογχιολίτις, BOOP)
- Φαρμακευτικές πνευμονοπάθειες
- Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση
- Εωσινοφιλική πνευμονία
- Σιλίκωση
- Νοσήματα συνδετικού ιστού
- Ιογενείς λοιμώξεις
- HIV λοίμωξη
- Οξεία απόρριψη μοσχεύματος πνεύμονα
- Αποφρακτική βρογχιολίτιδα/χρόνια απόρριψη μοσχεύματος πνεύμονα
- GVHD

Διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου

Νοσήματα με φυσιολογικό λόγο CD4/CD8

- Φυματίωση
- Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία (όψιμη φάση)

Διαγνωστική σημασία ανοσοφαινότυπου

Σαρκοείδωση, λόγος CD4/CD8

Μεταβλητότητα του λόγου CD4/CD8 στα στάδια της νόσου

Στάδια της νόσου

- Στάδιο 0: φυσιολογική α/α θώρακος
- Στάδιο I: Λεμφαδενοπάθεια άμφω (πύλες)
- Στάδιο II: Λεμφαδενοπάθεια άμφω + παρεγχυματικές διηθήσεις
- Στάδιο III: Παρεγχυματικές διηθήσεις
- Στάδιο IV: Πνευμονική ίνωση

Διαγνωστική σημασία ανοσοφαινότυπου

Σαρκοείδωση, λόγος CD4/CD8

Αύξηση λόγου CD4/CD8:	50-60% των ασθενών
Ελάττωση λόγου CD4/CD8:	15% των ασθενών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαφορετικών ερευνητικών ομάδων λόγος CD4/CD8 > 3,5 έχει ευαισθησία 52-59% και ειδικότητα 94-96%

Διαγνωστική σημασία ανοσοφαινότυπου

Σαρκοείδωση, λόγος CD4/CD8

CD103 ($\alpha\epsilon\beta_7$ ιντεγκρίνη): δεν εκφράζεται στα CD4 λεμφοκύτταρα ασθενών με Σαρκοείδωση

- Λόγος $CD103^+/CD4^+ < 0,31$ (MN Kolopp Sarda 2000)
- Λόγος $CD103^+CD4/CD4^+ < 0,2$ (M. Heron 2008)

CD11α (LFA-1): υψηλή έκφραση στα CD4 λεμφοκύτταρα

Διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου

Πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία

- NK-κύτταρα (CD56+, CD57+, CD16-): αύξηση

Ιστιοκυττάρωση Langerhans

- CD1a > 5%
- CD207 (Langerin)

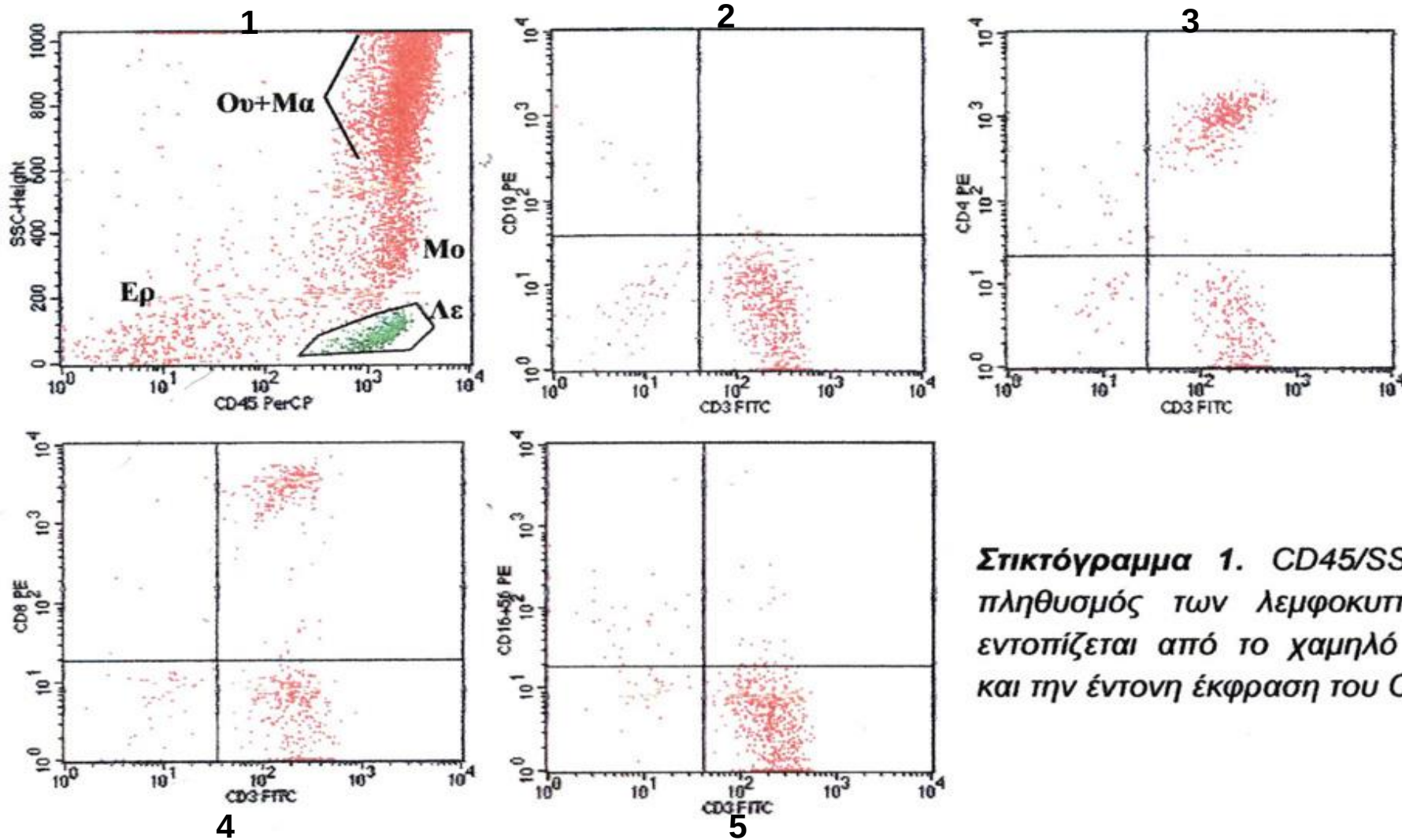
Ανοσοφαινότυπος λεμφοκυττάρων στο BAL

T-κύτταρα: CD3,CD4,CD8

B κύτταρα: CD19

NK κύτταρα: CD16/CD56

Ανοσοφαινότυπος λεμφοκυττάρων στο BAL



Στικτόγραμμα 1. CD45/SSC, ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων εντοπίζεται από το χαμηλό SSC και την έντονη έκφραση του CD45.

Ανάλυση των λεμφοκυττάρων στο BAL **Ε:** ερυθρά, **Λε:** Λεμφοκύτταρα, **Ου:** ουδετερόφιλα, **Μα:** Μακροφάγα, **Μο:** Μονοπύρρηνα

Ανοσοφαινότυπος λεμφοκυττάρων στο BAL

- $CD3^+$
- $CD19^+$
- $CD3^- CD16^+56^+$
- $CD3^+ CD16^+56^+$
- $CD3^+CD4^+$
- $CD3^+CD8^+$
- λόγος $CD3^+CD4^+ / CD3^+CD8^+$

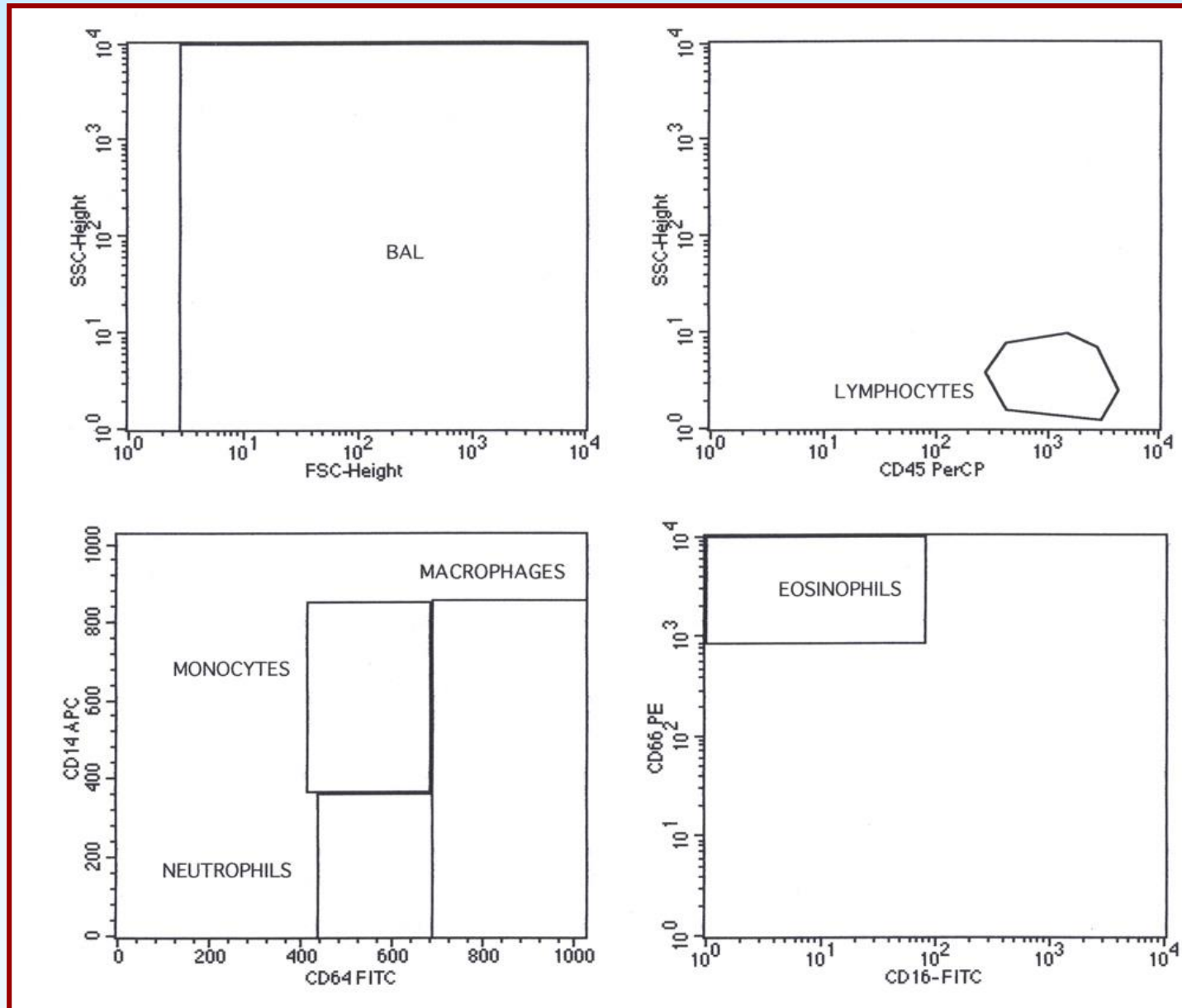
Προσδιορισμός μακροφάγων στο BAL

Μονοκλωνικά αντισώματα:

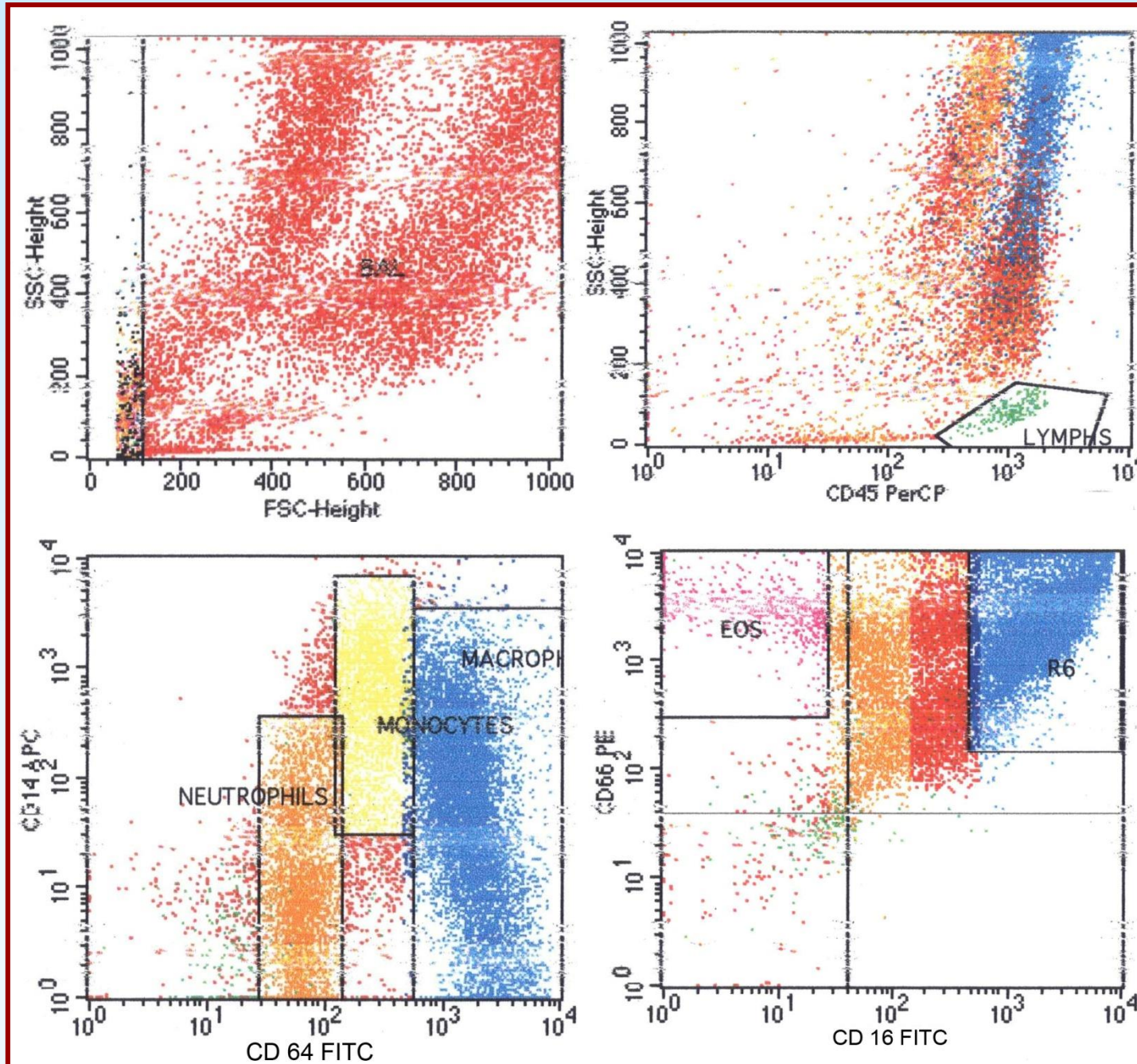
CD45, CD14, CD16, CD64

Γ. Πατεράκης, Γ.Ν.Α «Γ. Γεννηματάς»

Προσδιορισμός μακροφάγων στο BAL

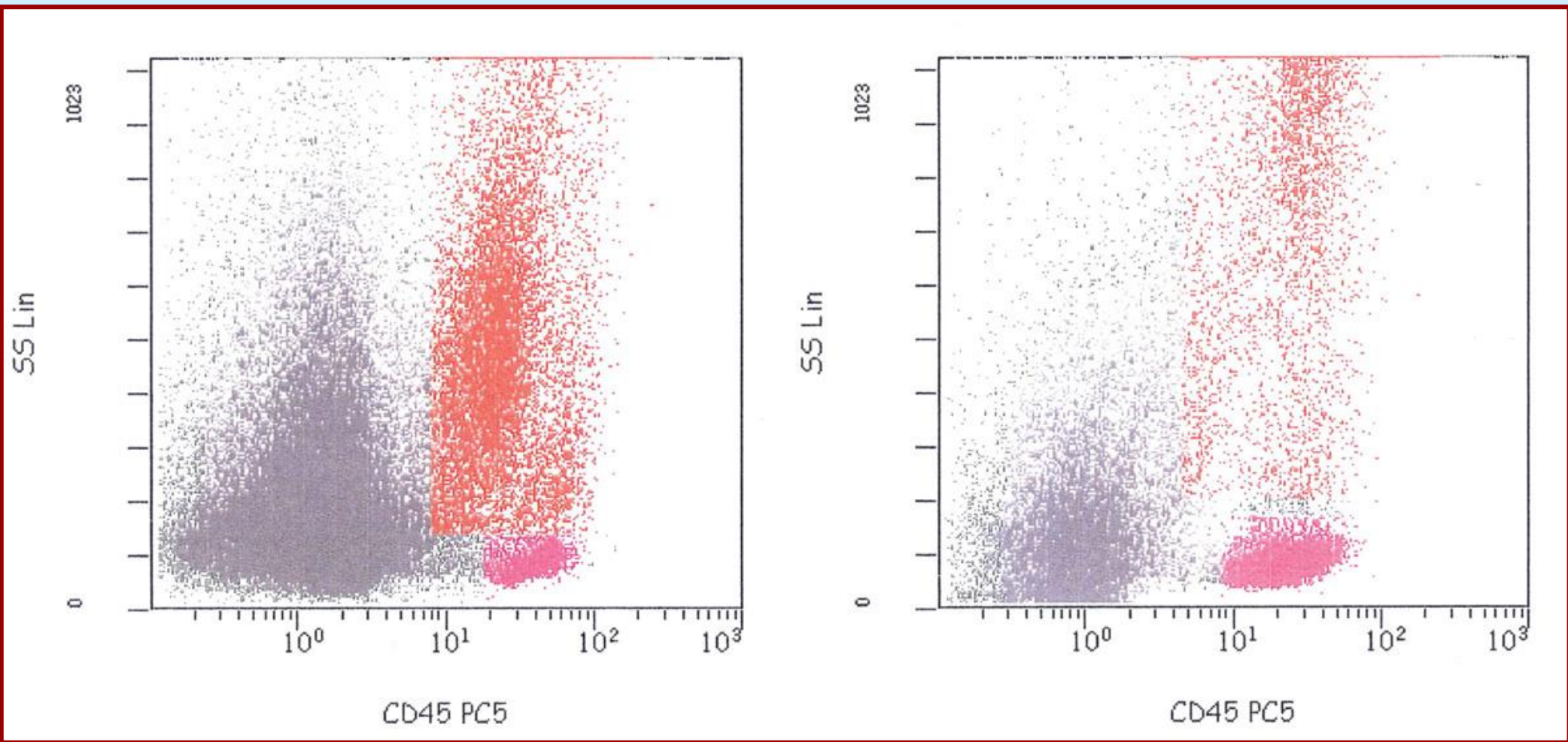


Προσδιορισμός μακροφάγων στο BAL

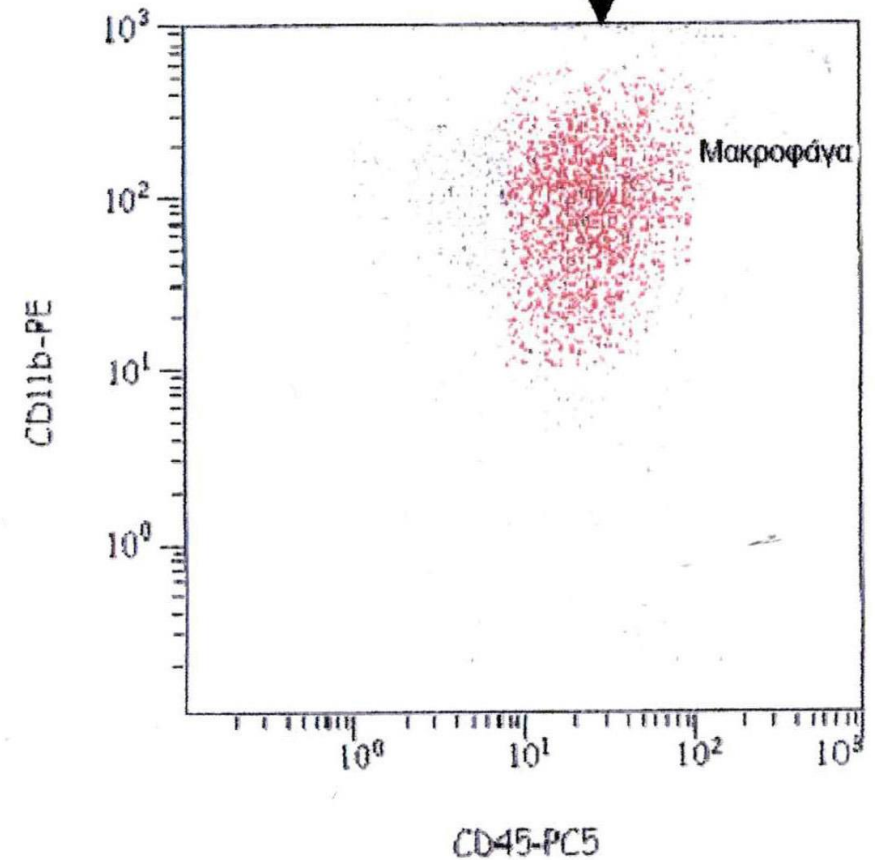
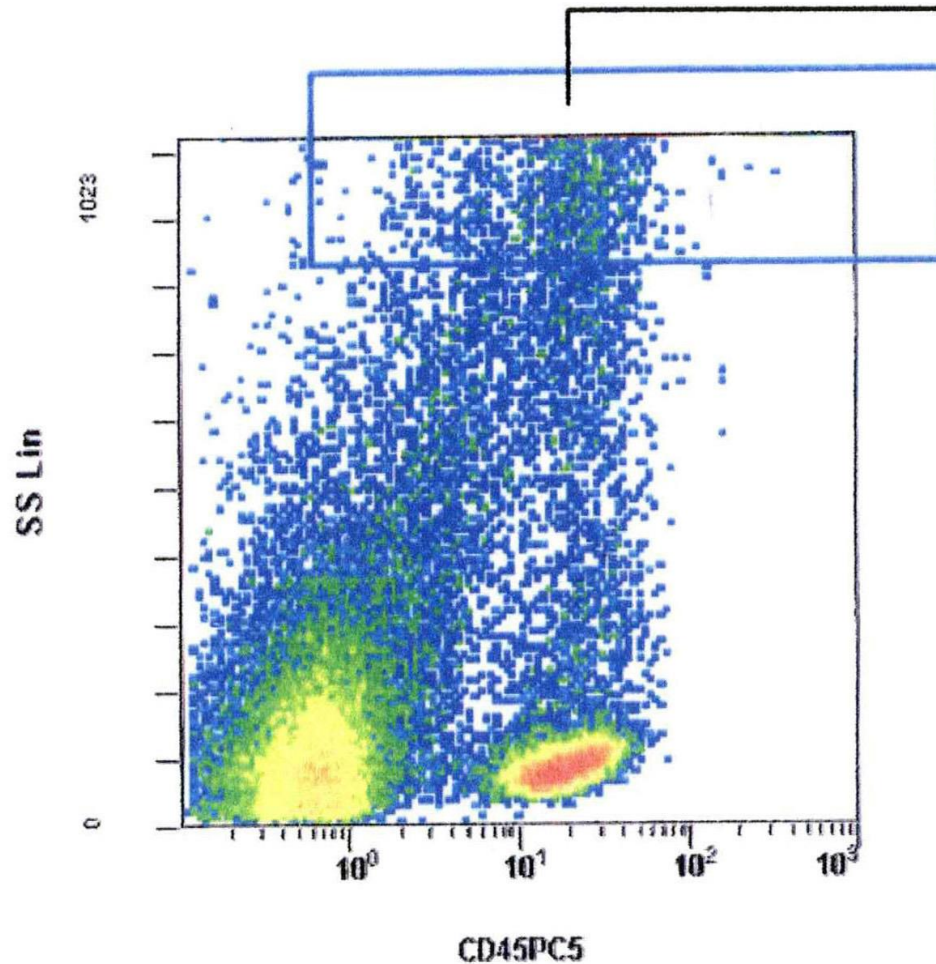


Ανοσοφαινότυπος στο BAL

1. CD45 PC5
2. CD11a FITC/CD11b PE/CD45 PC5
3. CD57 FITC/DRPE/CD45PCS/CD19 PC7
4. CD103 FITC/CD4PE/ CD3ECD/CD45PC5/CD8PC7

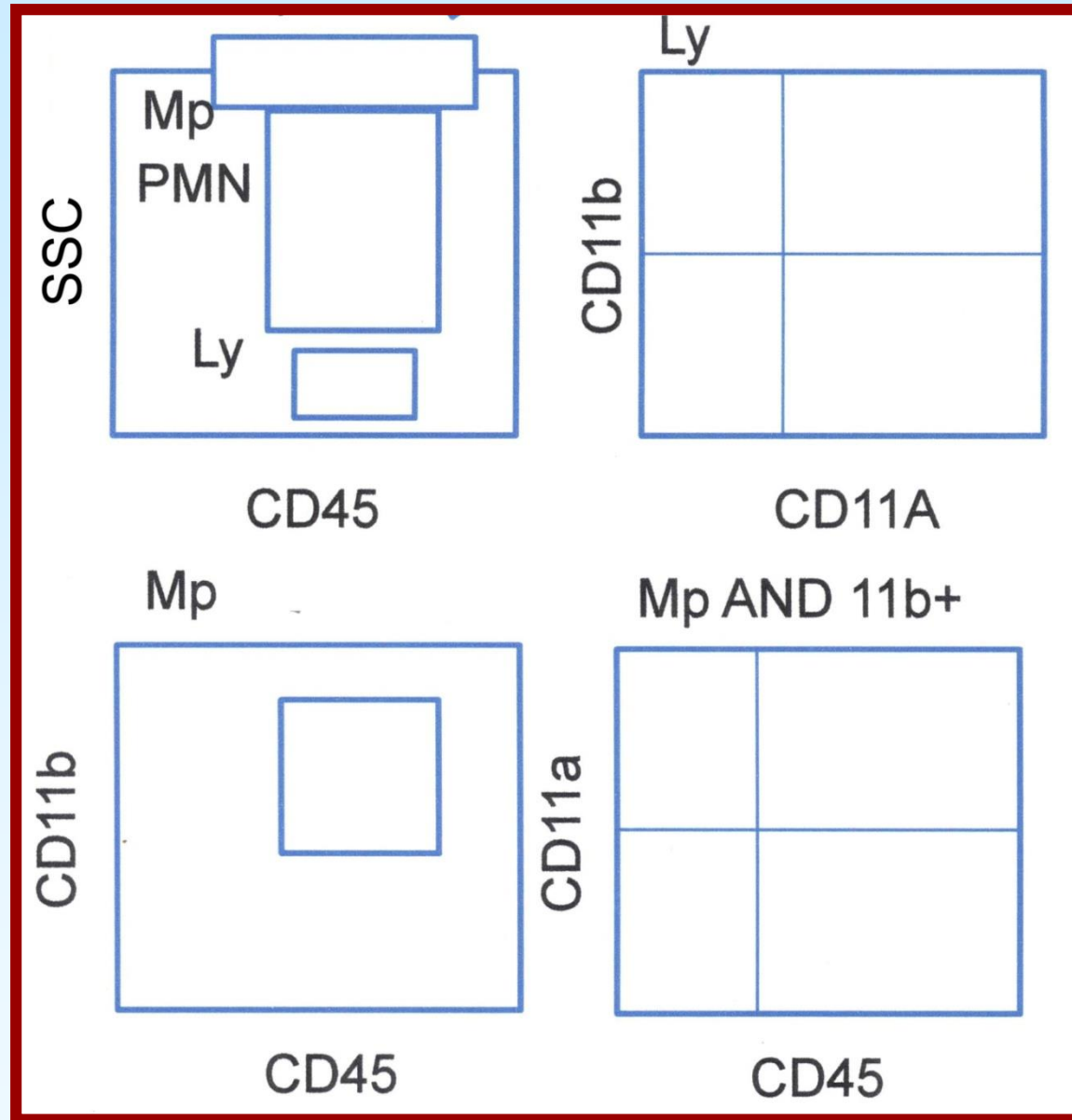


ESCCA course, St Etienne, September 9, 2009, MC Béné

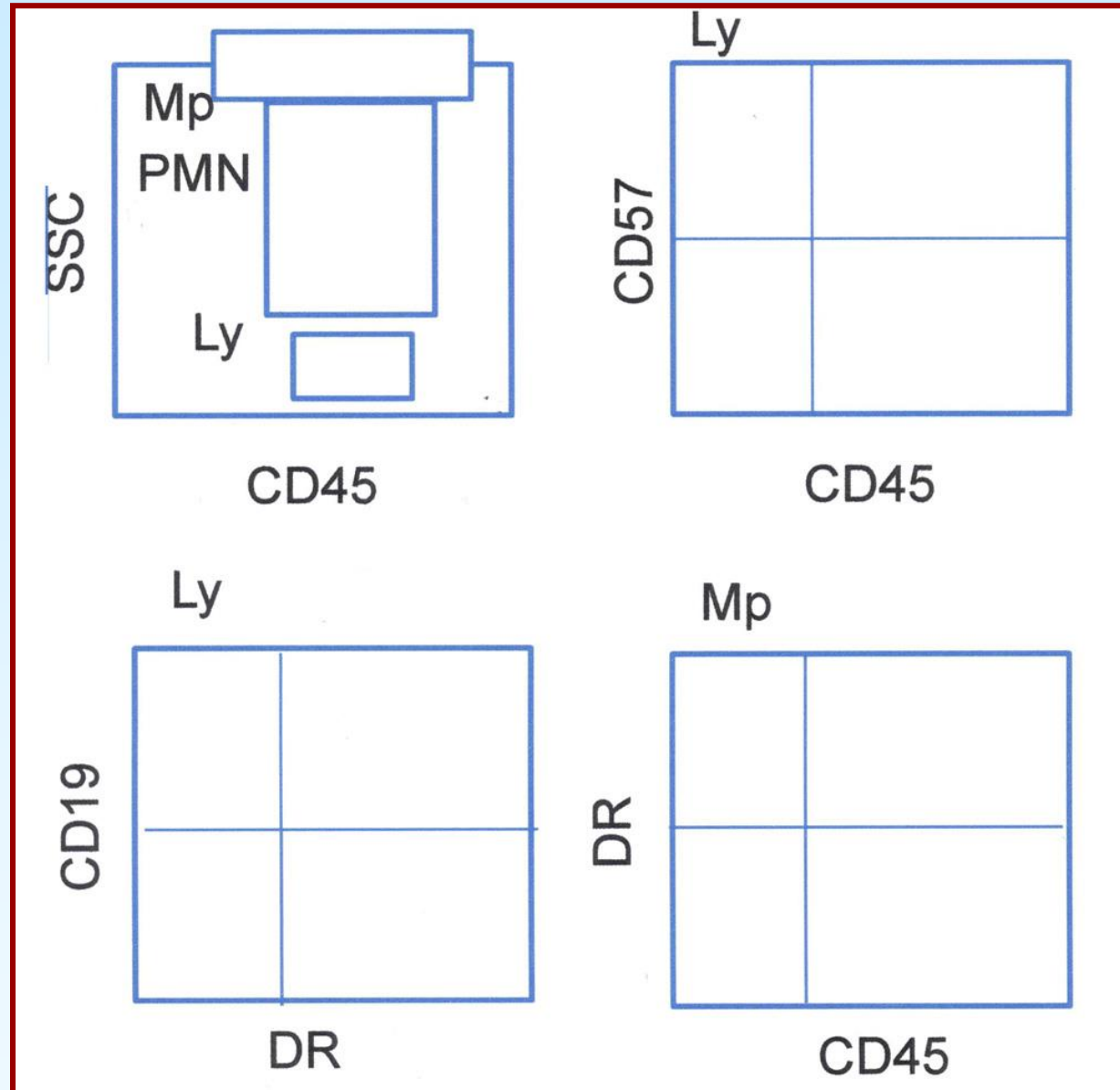


Ανάλυση των μακροφάγων στο BAL. Το gate γίνεται στην περιοχή των ευμεγέθων CD45+ κυττάρων και τα μακροφάγα αναγνωρίζονται από την έκφραση του CD11b.

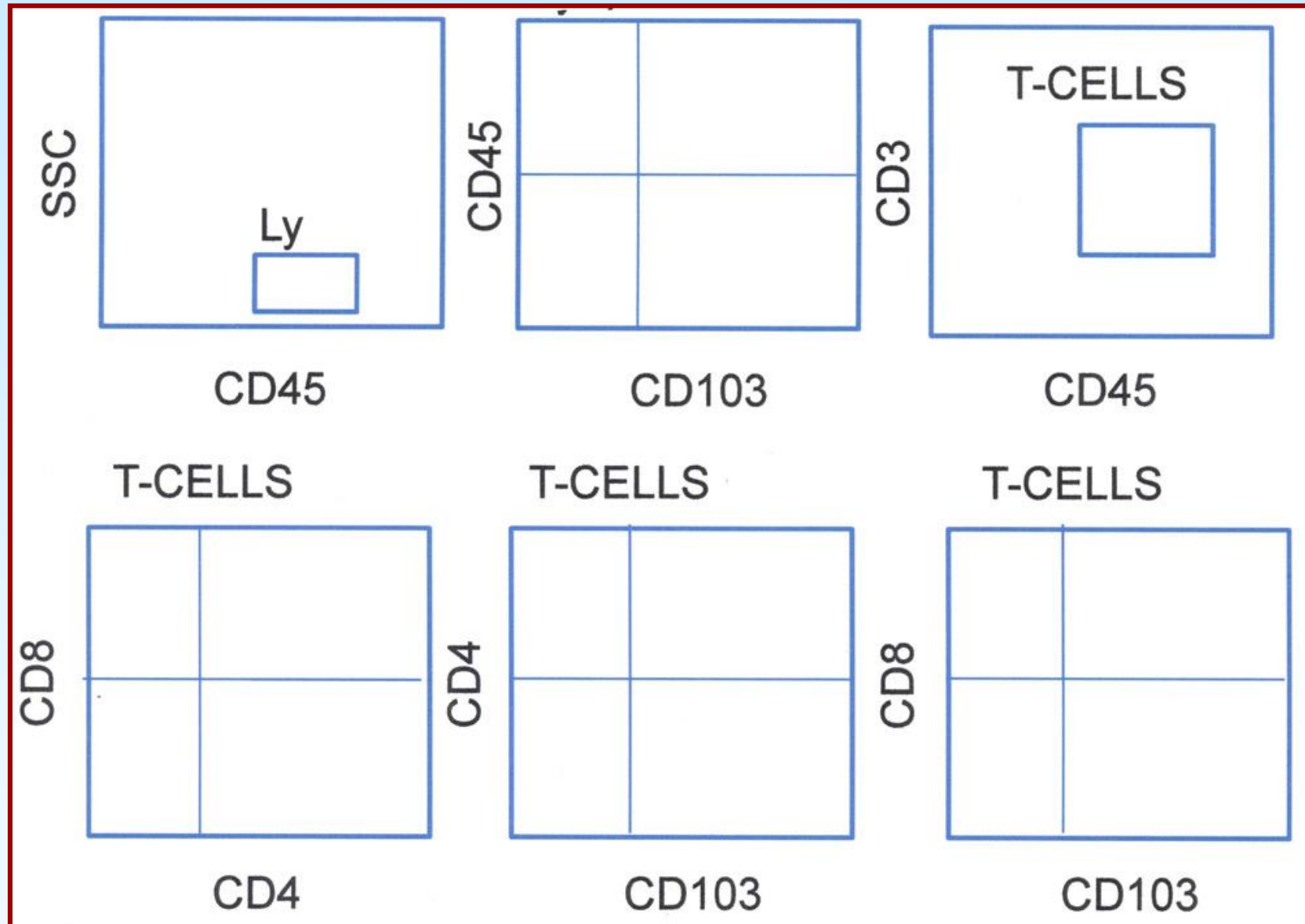
CD11α FITC / CD11bPE / CD45PC5



CD57 FITC / DRPE / CD45PC5 / CD19PC7



CD103 FITC / CD4PE / CD3ECD / CD45PC5 / CD8PC7



Σας ευχαριστώ

