ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ

Μ. Τζανουδάκη
Τμήμα Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν. Παίδων Αθηνών «Η Αγία Σοφία»

Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) έχει ολοένα και σημαντικότερο ρόλο τόσο σε κλινικό, όσο και σε ερευνητικό επίπεδο, με σημαντικότερη τη συμβολή της στη διάγνωση της διήθησης των μηνίγγων σε ασθενείς με κακοήθη αιματολογικά νοσήματα. Το ΕΝΥ, όμως, αποτελεί ένα βιολογικό υλικό του οποίου οι ιδιαιτερότητες είναι τέτοιες που επιβάλλουν την εφαρμογή ειδικών πρωτοκόλλων και χειρισμών για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Παρακάτω θα γίνει αναφορά, αρχικά σε τεχνικά θέματα σχετικά με τον χειρισμό του υλικού αυτού και, στη συνέχεια, σε ορισμένες εφαρμογές της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης του ΕΝΥ με κυτταρομετρία ροής.

Ιδιαιτερότητες του χειρισμού των δειγμάτων ΕΝΥ

Οι βασικότερες ιδιαιτερότητες του ΕΝΥ, οι οποίες και επηρεάζουν τα πρωτόκολλα επεξεργασίας του είναι οι εξής[1]:
Μικρός αριθμός των υπό μελέτη κυττάρων. Κατά τη μελέτη του ΕΝΥ με κυτταρομετρία ροής θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ότι αυτό αποτελεί ένα βιολογικό υγρό με ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων, πρόβλημα που επιτείνεται από το γεγονός ότι και ο συνολικός όγκος του εκάστοτε δείγματος είναι περιορισμένος και συνήθως πολύ μικρός. Για το λόγο αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται, ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι η μεγαλύτερη δυνατή. Επίσης, η μελέτη του δείγματος γίνεται σταδιακά, αρχικά με ένα συνδυασμό γενικότερων δεικτών και στη συνέχεια -ανάλογα με τα αρχικά αποτελέσματα- με τη μελέτη ειδικότερων δεικτών, ώστε να μην σπαταλάται άσκοπα πολύτιμο δείγμα. Η πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής έχει συμβάλει σημαντικά σε αυτό το σημείο, μειώνοντας τον αριθμό των απαιτούμενων σωληναρίων για δεδομένο όγκο πληροφοριών.
Χαμηλή βιωσιμότητα των κυττάρων στο ΕΝΥ. Το ίδιο το ΕΝΥ είναι τοξικό για τα κύτταρα που περιέχονται σε αυτό. Για το λόγο αυτό, η μελέτη του δείγματος θα πρέπει να γίνεται το αργότερο μέσα σε 1 ώρα από τη λήψη του. Εναλλακτικά, το δείγμα μπαίνει τη στιγμή της παρακέντησης σε σωληνάρια που περιέχουν συντηρητικό υλικό (RPMI +5%FCS ή ειδικό προϊόν του εμπορίου) και μπορεί να διατηρηθεί για 18 ώρες στους 4°C. Επιπλέον, η ευαισθησία των κυττάρων του ΕΝΥ δυσχεραίνει και την ενδοκυττάρια χρώση, η οποία συνιστάται να γίνεται όταν κρίνεται απολύτως απαραίτητη.
Πρόσμιξη αίματος. Σε ένα υλικό με τόσο μικρό αριθμό κυττάρων, η παραμικρή πρόσμιξη αίματος μπορεί να αλλοιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα. Σε περίπτωση τραυματικής παρακέντησης, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων που προέρχονται από πρόσμιξη αίματος προκύπτει με τη βοήθεια της γενικής εξέτασης αίματος, με τον εξής τύπο:

$$WBC_{\text{πρόσμιξης}} = WBC_{\text{αίματος}} \times RBC_{\text{ΕΝΥ}} / RBC_{\text{αίματος}}$$

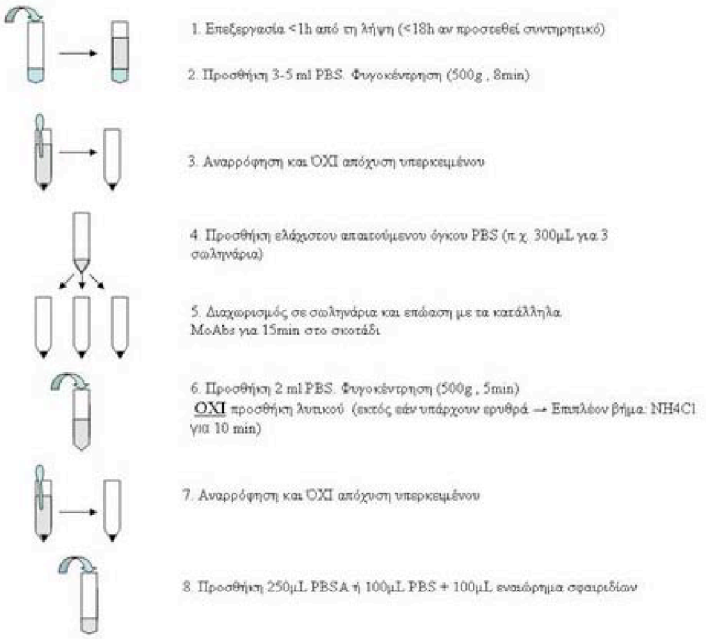
Υψηλή συγκέντρωση ελεύθερων ανοσοσφαιρινών. Σε περίπτωση μελέτης της έκφρασης των κ και λ ελαφρών αλύσων, οι ελεύθερες ανοσοσφαιρίνες (των οποίων η συγκέντρωση μπορεί να είναι υψηλή στο ΕΝΥ) μπορεί να δεσμεύσουν το αντιδραστήριο, με αποτέλεσμα μειωμένη ένταση χρώσης των κυττάρων. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, το αρχικό δείγμα αραιώνεται με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (π.χ. PBS), πριν τη φυγοκέντρηση και συμπύκνωσή του.
Προβλήματα ανάλυσης σπανίων γεγονότων. Όπως και σε κάθε περίπτωση μελέτης σπανίων πληθυσμών, είναι σημαντική η μείωση παρεμβολής του μη ειδικού σήματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σχολαστική καθαριότητα του μηχανήματος πριν την ανάλυση και με τη διαδοχική επιλογή πληθυσμών στην πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής.
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, έχει πρόσφατα προταθεί πρωτόκολλο ανάλυσης δειγμάτων του ΕΝΥ με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 1).

Εφαρμογές της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης του ΕΝΥ με κυτταρομετρία ροής

Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του ΕΝΥ σε κακοήθη αιματολογικά νοσήματα. Η σημαντικότερη κλινική εφαρμογή της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης του ΕΝΥ με ΚΡ είναι η ανίχνευση μηνιγγικής προσβολής σε ασθενείς με κακοήθη αιματολογικά νοσήματα, και ιδιαίτερα μυελικές ή Β-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες. Παραδοσιακά, η ανίχνευση της διήθησης των μηνίγγων είτε σε ασθενείς με συμβατή νευρολογική συμπτωματολογία είτε σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με υψηλό κίνδυνο προσβολής του ΚΝΣ, γίνεται με την κυτταρολογική εξέταση του ΕΝΥ, -δεδομένου ότι οι απεικονιστικές τεχνικές όπως η MRI έχουν χαμηλή ευαισθησία, όσον αφορά τις αιμοτολογικές κακοήθειες και οι μέθοδοι κυτταρογενετικής απαιτούν υψηλή συγκέντρωση κυττάρων. Η ευαισθησία, όμως, της μεθόδου αυτής είναι ιδιαίτερα χαμηλή (<50%) και εξαρτάται από την κυτταροβρίθεια των δειγμάτων. Η πολυχρωματική ΚΡ (χρήση 4-6 χρωμάτων) έχει δειχθεί ότι έχει τουλάχιστον 2-3 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την κυτταρολογική εξέταση του ΕΝΥ, υπερτερώντας σημαντικά σε δείγματα με συγκέντρωση κυττάρων <60/μL.[2-4]

Στο κοινώς αποδεκτό (consensus) πρωτόκολλο ανίχνευσης κακοήθων κυττάρων στο ΕΝΥ, προτείνεται η χρήση ενός συνδυασμού μονοκλωνικών στο 1/3 του συμπυκνωμένου δείγματος. Σε περίπτωση ανίχνευσης παθολογικών κυττάρων, η εξέταση ολοκληρώνεται με τη μελέτη επιπλέον δεικτών στα υπόλοιπα 2/3. Εάν, όμως, με τον πρώτο συνδυασμό δεν ανιχνευθούν παθολογικά κύτταρα, επαναλαμβάνεται η χρήση του αρχικού συνδυασμού στα 2/3 του δείγματος, τα οποία περιέχουν διπλάσιο αριθμό κυττάρων, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της εξέτασης. Οι προτεινόμενοι συνδυασμοί μονοκλωνικών για ΚΡ 5 χρωμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 1. Στις μελέτες όπου χρησιμοποιείται τετραχρωμία, το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν ανιχνεύεται ομάδα με >25 συναθροιζόμενα παθολογικά κύτταρα, ύποπτο όταν τα κύτταρα της ομάδας είναι 10-25 και αρνητικό όταν τα κύτταρα αυτά είναι <10.[1,3]

Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του ΕΝΥ με ΚΡ φαίνεται να έχει σημαντική αρνητική προγνωστική αξία. Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, η πιθανότητα διήθησης των μηνίγγων θεωρείται ιδιαίτερα χαμηλή μετά από 3 αρνητικά αποτελέσματα σε δείγματα χωρίς πρόσμιξη αίματος. Παρόλα αυτά, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις αρνητικού αποτελέσματος της 4-χρωματικής ΚΡ σε δείγματα στα οποία έχει γίνει κατά την κυτταρολογική εξέταση η ανίχνευση κακοήθων κυττάρων. Για το λόγο αυτό, συνιστάται ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, ο οποίος έχει και σημαντική κλινική προγνωστική αξία.[3]



Εικόνα 1. *Συνοπτική περιγραφή του πρωτοκόλλου χειρισμού των δειγμάτων ΕΝΥ για ανάλυση με ΚΡ.*

Πίνακας 1. *Οι προτεινόμενοι συνδυασμοί πενταχρωματικής ΚΡ, όπως αυτοί δίνονται στο κοινώς αποδεκτό (consensus) πρωτόκολλο1. Στο ίδιο πρωτόκολλο προτείνονται επιπλέον συνδυασμοί 8-, 6-, 4- και 3-χρωματικής ΚΡ. Για όλους τους συνδυασμούς, εκτός από εκείνον της 3-χρωμίας, προτείνεται η χρήση κυτταρομετρητή ροής με δύο πηγές LASER, προϋπόθεση μη συμβατή με το σημερινό εξοπλισμό των περισσοτέρων εργαστηρίων στον ελληνικό χώρο. Έτσι, η βασική παρεχόμενη πληροφορία του παραπάνω αφορά κυρίως το συνδυασμό των δεικτών και όχι τόσο των φθοριοχρωμάτων. ΟΛ: Οξεία Λευχαιμία, ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, ΟΜΛ: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, ΠΜ: Πολλαπλό Μυέλωμα.*

Laser		Μπλε (488 nm)				Κόκκινη (635nm)
Πληθυσμός προς ανίχνευση	Νο σωληναρίου	FITC	PE	PE-TR	PEC5	APC7
Άγνωστος	1	CD8+λ	CD56+κ	CD45	CD4+CD19	CD3
	2	CD5	CD10	CD45	CD19	CD22
Β	1	κ	λ	CD19	CD45	CDx
	2	CD20	CD10	CD45	CD19	CDx
Τ	1	CD8	CD7	CD5	CD4	CD3
	2	CD2	CD56	CD5	CD7	CD3
ΟΛ	1	CD34	CD10	CD45	CD7	CD19
ΟΛΛ	1	CD5	CD10	CD45	CD7	CD19
ΟΜΛ	1	CD34	CD117	CD45	CD33	HLADR
ΠΜ	1	CD38	CD138	CD45	CD56	CD19

Κύτταρα του ΕΝΥ σε νευρολογικά νοσήματα. Στα πλαίσια της προσπάθειας κατανόησης της παθοφυσιολογίας της νόσου, έχουν γίνει μελέτες των λευκοκυτταρικών πληθυσμών του ΕΝΥ σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η αυξημένη σχέση Β-λεμφοκυττάρων/μονοκυττάρων έχει συσχετιστεί με βαρύτερη πορεία της νόσου,[5] ενώ είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι η χορήγηση rituximab επηρεάζει πολύ λιγότερο τον πληθυσμό των Β-λεμφοκυττάρων του ΕΝΥ σε σχέση με τα Β-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, εύρημα με πιθανές θεραπευτικές προεκτάσεις.[6]

Παράρτημα

Αντί επιλόγου παρατίθενται ένας πίνακας φυσιολογικών τιμών των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών του ΕΝΥ στους ενήλικες,[7] αλλά και ένας κατάλογος διαφόρων παθολογικών καταστάσεων οι οποίες προκαλούν πλειοκύττωση του ΕΝΥ, κάτι που μπορεί να δυσχεράνει την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ελέγχου με ΚΡ, αλλά ενδεχομένως να δώσει έναυσμα για περαιτέρω εφαρμογές της.

Πίνακας 2. *Φυσιολογικές τιμές λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στο ΕΝΥ ενηλίκων.*

Λεμφοκυτταρικός υποπληθυσμός στο ΕΝΥ	Μέση τιμή (κύτταρα /μL)	5η και 95η εκατοστιαία θέση (κύτταρα /μL)
Τ-λεμφοκύτταρα	0,46	0,2-2,02
CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα	0,34	0,12-1,36
CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα	0,13	0,06-1
Β-λεμφοκύτταρα	0,005	0-0,034
ΝΚ-κύτταρα	0,011	0,002-0,058

Αίτια αύξησης λεμφοκυττάρων στο ΕΝΥ: (1) Μηνιγγίτιδα (ιογενής, φυματιώδης, μυκητιασική, συφιλιδική, από ασυνήθη βακτήρια, παρασιτική, άσηπτη λόγω παρακείμενης σηπτικής εστίας), (2) εκφυλιστικά νοσήματα (υποξεία σκληρυντική πανεγκεφαλίτιδα, πολλαπλή σκλήρυνση, εγκεφαλίτιδα από κατάχρηση ουσιών, σύνδρομο Guillain-Barré, οξεία διάχυτη εγκεφαλομυελίτιδα), (3) άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις (σύνδρομο Handl, σαρκοείδωση των μηνίγγων, πολυνευρίτιδα, περιαρτηρίτιδα του ΚΝΣ).

Αίτια αύξησης ουδετεροφίλων στο ΕΝΥ: (1) Μηνιγγίτιδα (μικροβιακή, αρχικό στάδιο ιογενούς, αρχικό στάδιο φυματιώδους, αμοιβαδική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα), (2) άλλες λοιμώξεις (εγκεφαλικό απόστημα, υποσκληρίδιο εμπύημα, σχετιζόμενη με το AIDS CMV-ριζίτιδα), (3) σπασμοί, (4) αιμορραγία, (5) έμφρακτο ΚΝΣ, (6) *επανειλημμένες ΟΝΠ*, (7) *έγχυση ξένων υλικών στον υπαραχνοειδή χώρο (μεθοτρεξάτης, σκιαγραφικών)*, (8) μεταστατικός όγκος σε επαφή με το ΚΝΣ.

Αίτια αύξησης πλασματοκυττάρων στο ΕΝΥ: (1) Οξείες ιογενείς λοιμώξεις, (2) σύνδρομο Guillain-Barré, (3) πολλαπλή σκλήρυνση, (4) παρασιτικές λοιμώξεις, (5) σαρκοείδωση, (6) υποξεία σκληρυντική πανεγκεφαλίτιδα, (7) συφιλιδική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, (8) φυματιώδης μηνιγγίτιδα.

Αίτια αύξησης ηωσινοφίλων στο ΕΝΥ: *Συχνά* συσχετίζεται με: (1) οξεία πολυνευρίτιδα, (2) αντίδραση σε ξένο σώμα (φάρμακα, παροχετεύσεις), (3) μυκητιασικές λοιμώξεις, (4) ιδιοπαθή ηωσινοφιλική μηνιγγίτιδα (5) ιδιοπαθές υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο, (6) παρασιτικές λοιμώξεις. *Σπανιότερα* συσχετίζεται με: (1) βακτηριακή ή ιογενή μηνιγγίτιδα, (2) φυματιώδη μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, (3) ρικετσίωση, (4) λευχαιμία/λέμφωμα, (5) μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές, (6) νευροσαρκοείδωση, (7) πρωτοπαθείς όγκους του ΚΝΣ.

Βιβλιογραφία

1. Kraan, J., et al., *Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid*. Curr Protoc Cytom, 2008. Chapter 6: p. Unit 6 25.
2. Hegde, U., et al., *High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology*. Blood, 2005. **105**(2): p. 496-502.
3. Bromberg, J.E., et al., *CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies*. Neurology, 2007. **68**(20): p. 1674-9.
4. Quijano, S., et al., *Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry*. J Clin Oncol, 2009. **27**(9): p. 1462-9.
5. Cepok, S., et al., *Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis*. Brain, 2001. **124**(Pt 11): p. 2169-76
6. Monson, N.L., et al., *Effect of rituximab on the peripheral blood and cerebrospinal fluid B cells in patients with primary progressive multiple sclerosis*. Arch Neurol, 2005. **62**(2): p. 258-64.
7. de Graaf, M., et al., *B and T cell imbalances in CSF of patients with Hu-antibody associated PNS*. J Neuroimmunol, 2008. **195**(1-2): p. 164-70.
8. Richard A. McPherson MD, M.R.P.M.P., *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Vol. 1. 2007, Philadelphia: Saunders Elsevier. 460-461.

ΜΕΛΕΤΗ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ

Ό. Χατζηζήση
Επιμελήτρια, Ανοσολογικό Εργαστήριο Πνευμονολογικής Κλινικής Α.Π.Θ., Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage, BAL) είναι το υλικό έκπλυσης συγκεκριμένου βρογχοκυψελιδικού χώρου με φυσιολογικό ορό για διαγνωστικούς λόγους. Η τεχνική λήψης του BAL περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1974 από τους Reynolds και Newball. Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση είναι μία ασφαλής, ημι-επεμβατική τεχνική, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης. Το BAL περιέχει κύτταρα και άλλα διαλυτά μόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια κ.ά. που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Από κλινική άποψη, η μελέτη του BAL έχει αναδειχθεί σε μία χρήσιμη μέθοδο διάγνωσης και παρακολούθησης της πορείας διαφόρων νοσημάτων του πνεύμονα κυρίως του διάμεσου χώρου (διάμεσες πνευμονοπάθειες), αλλά και λοιμώξεων, καθώς και κακόηθων νοσημάτων (Πίνακας 2). Σαν εργαλείο έρευνας, είναι χρήσιμο στη διερεύνηση της ανοσοπαθογένειας των πνευμονικών παθήσεων. Τα ευρήματα από την ανάλυση του BAL αντικατοπτρίζουν, σε σημαντικό βαθμό, τα συμβαίνοντα στο διάμεσο χώρο του πνεύμονα και συμβάλλουν στην κατανόηση των ανοσιακών και φλεγμονωδών μηχανισμών, που επικρατούν στις παραπάνω παθήσεις.

Πίνακας 1. *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

Rose SA Semin Respir Crit Care Med 2007

Πίνακας 2. *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
Διάχυτες διηθητικές πνευμονοπάθειες
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
Πνευμονοπάθειες παιδιών
Λοίμωξη Διάμεση πνευμονοπάθεια Εισρόφηση Αιμορραγία Κυστική ίνωση

Meyer KC, Semin Respir Crit Care Med 2007

Λήψη και επεξεργασία BAL

Η λήψη του BAL πραγματοποιείται με εύκαμπτο ινοβρογχοσκόπιο μετά από ενσφήνωσή του στον κατάλληλο βρόγχο, σταδιακή έγχυση ποσότητας φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας 37oC και ακολούθως αναρρόφηση του εκπλύματος. Τα εκπλύματα λαμβάνονται από την περιοχή της ιστολογικής βλάβης, σύμφωνα με τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας υψηλής ευκρίνειας.
Τα κύρια βήματα για την επεξεργασία του δείγματος είναι:

- Μέτρηση του συνολικού όγκου του αναρροφώμενου εκπλύματος
- Διήθηση του εκπλύματος με αποστειρωμένη – νάϋλον γάζα για την απομάκρυνση της βρογχικής βλένης, όταν απαιτείται.
- Φυγοκέντρηση του υλικού και λήψη του ιζήματος των κυττάρων.
- Έκπλυση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό (RPMI, Hepes ή άλλο)
- Παρασκευή εναιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (RPMI, Hepes ή άλλο)
- Μέτρηση του ολικού αριθμού των κυττάρων και, εάν χρειάζεται, προσαρμογή της συγκέντρωσης σε 106 κύτταρα/ml εναιωρήματος, με κατάλληλη αυξομείωση του όγκου.
- Φυγοκέντρηση μικρής ποσότητας (50-100 μl) του υλικού σε κυτταροφυγόκεντρο και λήψη παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Χρώση των παρασκευασμάτων με χρωστική May Grunwald-Ciemsa
- Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων και προσδιορισμός του κυτταρικού τύπου
- Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων (50-100 μl του εναιωρήματος κυττάρων για κάθε σωληνάριο)

Σύνθεση κυτταρικού πληθυσμού στους υγιείς

Ο κυτταρικός πληθυσμός στο BAL σε υγιή άτομα, μη καπνιστές, αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό από μακροφάγα και σε μικρότερα ποσοστά από λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, μαστοκύτταρα, πλασματοκύτταρα (πίν. 3). Αύξηση των μακροφάγων και ουδετεροφίλων και ελάττωση των λεμφοκυττάρων παρατηρείται στους καπνιστές.
Τα Τ-κύτταρα (CD3+) υπερέχουν στο BAL και αποτελούν το 70-90% των λεμφοκυττάρων, ενώ τα Β-κύτταρα (CD19+) είναι πολύ λιγότερα κάτω από 5%. Λίγα είναι επίσης NK (CD56), 1-5% και σπάνια τα NKT κύτταρα. Η αναλογία των CD4 και CD8 υποπληθυσμών των Τ-κυττάρων είναι όμοια με αυτή στο αίμα και κυμαίνεται από 1,5 έως 2,5.

Πίνακας 3. *Κυτταρικός πληθυσμός στο BAL*

Κύτταρα/ml x 10^3	50-150 x 10^3
Μακροφάγα	80-85%
Λεμφοκύτταρα	5-12%
Ουδετερόφιλα	3-8%
Εωσινόφιλα	0-2%

Eur Resp. J 1989; 2: 561-585

Τα μακροφάγα είναι ένας μικτός κυτταρικός πληθυσμός αποτελούμενος από τα ιστικά (τοπικά) μακροφάγα των αεραγωγών, των κυψελίδων και του διάμεσου χώρου καθώς και από τα εκ μετανάστευσης μακροφάγα (μονοπύρηνα) του αίματος. Ο διαχωρισμός τους είναι δύσκολος τόσο μορφολογικά, όσο και κυτταρομετρικά (αυτοφθορισμός και πολυάριθμοι Fc υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια).
Στα κύτταρα του BAL περιέχεται και σημαντικός αριθμός επιθηλιακών κυττάρων, βρογχικής προέλευσης. Τα κύτταρα αυτά δεν προσμετρώνται στον κυτταρικό τύπο του BAL, αλλά σημειώνονται ιδιαίτερα. Ο αριθμός τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 κύτταρα ανά 100 κύτταρα BAL. Υπέρβαση του ορίου αυτού θεωρείται ένδειξη μεγάλης δυσαναλογίας μεταξύ του βρογχικού και του συνολικού εκπλυθέντος χώρου, γεγονός που μειώνει την αξιοπιστία των ευρημάτων, ιδιαίτερα όσον αφορά την προέλευση των στοιχείων του BAL. Γενικότερα, αποτελεί ένδειξη μη ορθής διεξαγωγής της έκπλυσης.

Διαγνωστική αξία του BAL

Η μελέτη του BAL μπορεί να συμβάλλει στη διάγνωση διάφορων μορφών κυψελιδίτιδων, που αποτελούν την κύρια ιστοπαθολογική βλάβη πολλών διάμεσων διάχυτων πνευμονοπαθειών. Το BAL αποτελεί διαγνωστική εξέταση για ορισμένες πνευμονοπάθειες, όπως η κυψελιδική πρωτεϊνωση, η πνευμονική αιμοσιδήρωση, η ιστιοκυττάρωση Langerhans. Επιπλέον, η όψη του BAL, η ανεύρεση παθογόνων, τα ευρήματα από τη μελέτη των κυττάρων (κυτταρικός τύπος, μορφολογία, ανοσοφαινό-τυπος) σε συνδυασμό με το ιστορικό των ασθενών και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις μπορούν να βοηθήσουν

σημαντικά στην τελική διάγνωση και άλλων νοσημάτων. Στις περισσότερες διάμεσες διάχυτες πνευμονοπάθειες παρατηρείται μεταβολή του κυττα-ρικού τύπου, η οποία προκαλείται από την αύξηση των λεμφοκυττάρων ή των ουδετε-ροφίλων ή των εωσινοφίλων. Σε ορισμένα νοσήματα η αύξηση αφορά περισσότερους του ενός πληθυσμούς (π.χ. διάμεση ίνωση). Επίσης, σε κάποια νοσήματα παρατη-ρείται αύξηση των μαστοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων (πίν. 4).

Πίνακας 4. *Τύπος κυττάρων στο BAL σε διάφορα νοσήματα.*

Λεμφοκύτταρα (≥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 (≥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 (≥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

Meyer KC, Semin Respir Crit Care Med 2007

Σημαντικές πληροφορίες προσκομίζει η μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων π.χ. αφρώδη μακροφάγα, λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστικά βλαστών, κ.ά.

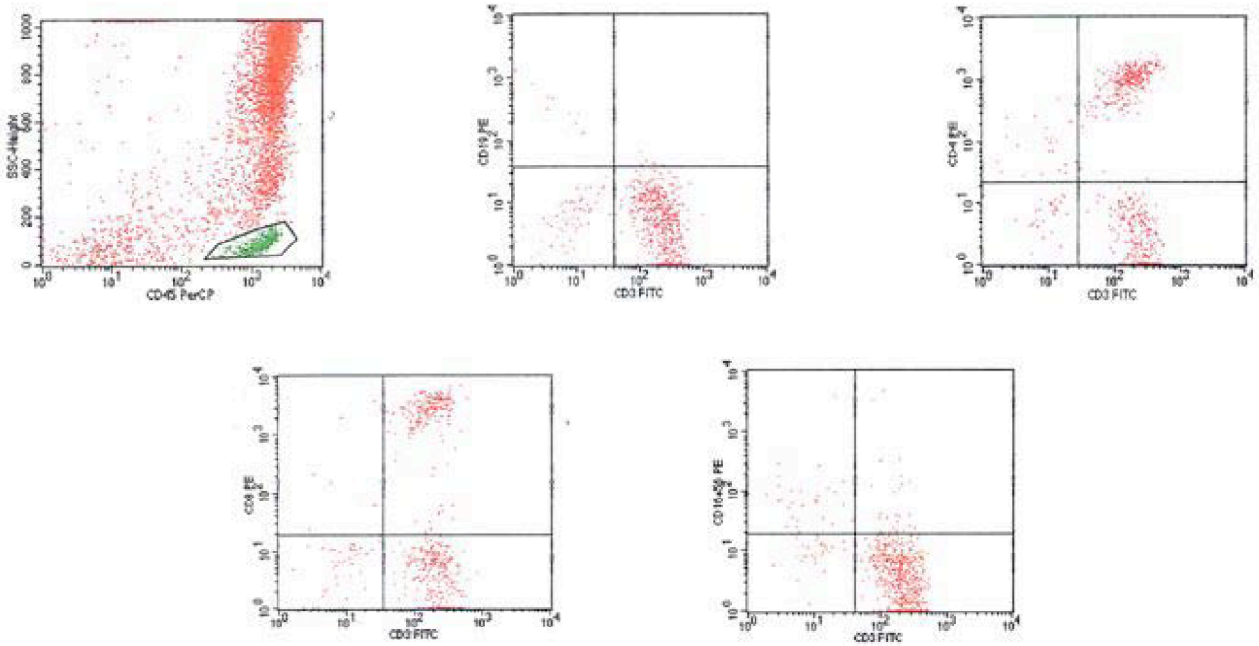
Διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου

Οι μεταβολές των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε πολλές διάμεσες πνευμονοπάθειες. Τα νοσήματα με αυξημένο αριθμό λεμφοκυτ-τάρων στο BAL μπορούν να διαχωρισθούν σε νοσήματα με αυξημένο, φυσιολογικό ή ελαττωμένο λόγο CD4/CD8. Όμως, ούτε ο αριθμός των λεμφοκυττάρων, ούτε ο λόγος CD4/CD8 αποτελούν ειδικά ευρήματα χαρακτηριστικά των πνευμονικών παθήσεων. Σε ορισμένα νοσήματα, όπως στη σαρκοείδωση, στη βηρυλλίωση, στην ασβέστωση ανευρίσκεται CD4-λεμφοκυττάρωση, ενώ στην πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία (οξεία φάση), στην κρυπτογενή οργανοποιό πνευμονία, στις φαρμακευτικές πνευμονοπάθειες, στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, στην εωσινοφιλική πνευμονία, στη σιλίκωση, σε νοσήματα του συνδετικού ιστού, στη GVHD, σε ιογενείς λοιμώξεις ανευρίσκεται CD8-λεμφοκυττάρωση. Ειδικά, όσον αφορά τη σαρκοείδωση, η διαγνωστική αξία του λόγου CD4/CD8 έχει αμφισβητηθεί τελευταία λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας που εμφανίζεται μεταξύ των σταδίων της νόσου. Αύξηση του λόγου CD4/CD8 παρατηρείται στο 50-60% και ελάττωση στο 15% των ασθενών. Διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, οι οποίες έχουν μελετήσει τη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα της σχέσης CD4/CD8 σε ασθενείς με σαρκοείδωση που την εμφανίζουν αυξημένη, έχουν καταλήξει σε όμοια συμπεράσματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, λόγος > 3,5 έχει ευαισθησία 52-59% και ειδικότητα 94-96%. Πρόσφατα, στο διαγνωστικό έλεγχο της σαρκοείδωσης έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται η έκφραση της ιντεγκρίνης $\alpha^E\beta 7$ (CD103). Σε αποτελέσματα δύο μελετών φαίνεται ότι, τα CD4 λεμφοκύτταρα στο BAL ασθενών με σαρκοείδωση να μην εκφράζουν το μόριο CD103.

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση – Κυτταρομετρία ροής

Λεμφοκύτταρα

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων του BAL, βασικά, περιλαμβάνει τη μελέτη των Τ-κυττάρων (CD3+), των υποπληθυσμών (CD4+ και CD8+), των Β κυττάρων (CD19+) και των NK κυττάρων (CD16+ CD56+). Εικ. 1. Σε περίπτωση που υπάρχει η δυνατότητα πολυχρωματικής ανάλυσης ενδείκνυται η μελέτη της έκφρασης και άλλων δεικτών, όπως HLA-DR, CD11α, CD103, CD57.

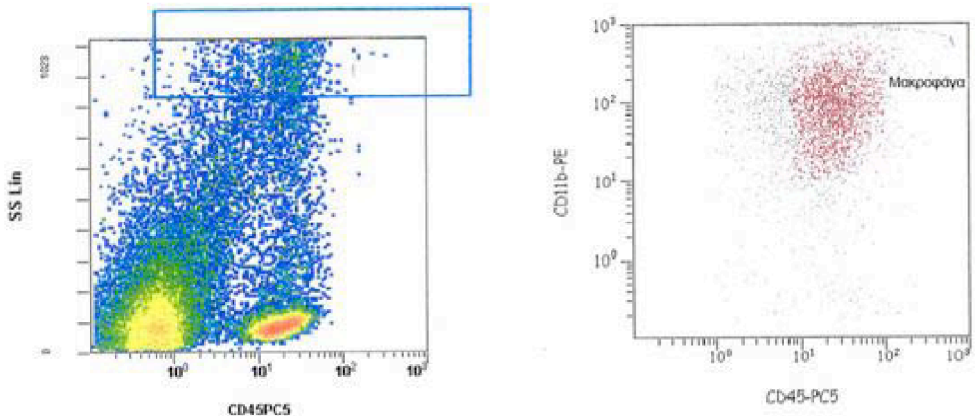


Εικόνα 1. *Ανάλυση των λεμφοκυττάρων στο BAL.* ***Ε:*** *ερυθρά,* ***Λε:*** *Λεμφοκύτταρα,* ***Ου:*** *ουδετερόφιλα,* ***Μα:*** *Μακροφάγα,* ***Μο:*** *Μονοπύρηνα.*

Μακροφάγα

Τα κυψελιδικά μακροφάγα αν και εκφράζουν πολλούς δείκτες, όπως CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD64, CD68, CD206, κ.ά., είναι δύσκολο τα τυποποιηθούν με κυτταρομετρία ροής. Τα σοβαρότερα προβλήματα στη μελέτη του ανοσοφαινότυπου των κυψελιδικών μακροφάγων οφείλονται στον έντονο αυτοφθορισμό τους και στην έλλειψη ειδικού αντιδραστηρίου για την τυποποίησή τους (Εικ. 2).

Ένας άλλος δείκτης που προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής, εφόσον υπάρχει κλινική ένδειξη ιστιοκυττάρωσης Χ, είναι το μόριο CD1a στα κύτταρα Langerhans.



Εικόνα 2. *Ανάλυση των μακροφάγων στο BAL. Το gate γίνεται στην περιοχή των ευμεγέθων CD45+ κυττάρων και τα μακροφάγα αναγνωρίζονται από την έκφραση του CD11b.*

Βιβλιογραφία

1. Meyer KC. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 546-570.
2. Merchant RK et al. Am Rev Rerpir Dis 1992; 146: 448-453.
3. Costabel U et al. Current opinion in Pulmonary Medicine 2001; 7: 255-261.
4. Hodge SJ et al. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 61B: 27-34 (2004).
5. Rose SA et al. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 561-574.
6. Drent M et al. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 486-495
7. Béné MC. 5th European Course on Clinical Cytometry.
8. Kolopp Sarda MN et al. Lab Invest vol. 80, No 7, p. 1065-1069.
9. Heron M. et al. Clinical Immunology 2008; 126, 338-344.
10. Barry SM et al. J Immunol Methods 2004 Feb 1; 285(1); 15-23.
11. Kirby AC et al. J Infect Dis 2006; 193: 205-213.
12. Guth AM et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2009; 296: 936-946.
13. Technical recommendations and guidelines for BAL. Report of the European Society of Pneumonology Task Group. Eur Resp J 1989; 2: 561-585.