

Wskazówki Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące metod pozyskiwania, opracowywania oraz oceny płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL)

Recommendation of the Polish Respiratory Society for bronchoalveolar lavage (BAL) sampling, processing and analysis methods

Dokument opracował zespół w składzie:

Dr hab. n. med. Andrzej Chciałowski prof. nadzw.
Dr hab. n. med. Joanna Chorostowska-Wynimko prof. nadzw.
Dr hab. n. med. Andrzej Fal prof. nadzw.
Dr n. med. Robert Pawłowicz
Dr hab. n. med. Joanna Domagała-Kulawik

Recenzenci:

Prof. dr hab. n. med. Michał Pirożyński
Dr n. med. Wojciech Piotrowski
Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Śladek

Redakcja:

Dr hab. n. med. Joanna Domagała-Kulawik
Przewodnicząca Sekcji Diagnostyki Klinicznej PTChP

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 2: 75–89

Spis treści

Wprowadzenie	77
Skróty	77
Definicja	78
Metodyka wykonania BAL	78
Wskazania	78
Przeciwwskazania	78
Przygotowanie do badania	79
Znieczulenie i premedykacja	79
Sedacja	79
Zasady przeprowadzenia badania	80
Postępowanie po badaniu	81
Powikłania	81
Przekazywanie materiału do laboratorium	81
Opracowanie materiału z BAL	81
Postępowanie wstępne	81
Filtrowanie materiału	82
Całkowita liczba komórek i ocena ich żywotności	82
Przygotowanie preparatów	83
Opracowanie preparatów	84
Wirowanie	84
Zabezpieczenie nadsącza	84
Ocena preparatów cytologicznych i metody dodatkowe	84
Ocena preparatów cytologicznych	84
Ocena fenotypu komórek	85
Badania mikrobiologiczne	86
Barwienia dodatkowe	86
Badanie składników nadsącza płynu z BAL	86
Wpływ czynników zewnętrznych na wynik badania płynu z BAL	86
Protokół badania	87
BAL w badaniach naukowych	87
Podziękowania	87
Piśmiennictwo	88

Wprowadzenie

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL, *bronchoalveolar lavage*) nadal zajmuje bardzo istotną pozycję w diagnostyce pierwotnych chorób płuc o różnym podłożu: infekcyjnych, śródmiąższowych, nowotworowych oraz patologii płucnych występujących w przebiegu innych schorzeń, w tym układowych. Specyfika tego badania wymaga ścisłego przestrzegania zasad poczynając od pobrania materiału, poprzez jego opracowanie, aż po interpretację wyniku. Niniejsze rekomendacje stanowią kompendium zaleceń metodycznych. Ich celem nie jest omawianie znaczenia diagnostycznego BAL w chorobach układu oddechowego. W praktyce klinicznej BAL ma nadal znaczenie pomocnicze, a podstawę rozpoznania stanowi jedynie w nielicznych chorobach płuc. Warto również podkreślić, że płyn z BAL jest wartościowym materiałem szeroko wykorzystywanym w badaniach naukowych.

Warunkiem niezbędnym do formułowania właściwych wniosków diagnostycznych i badawczych oraz wiarygodnego porównywania wyników badania między poszczególnymi ośrodkami jest jego jednolite i powtarzalne wykonanie, zgodne z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Zadaniem autorów pracy było rzetelne i przejrzyste przygotowanie wskazówek dotyczących prawidłowego pobrania i opracowania materiału z BAL. Wskazówki te powinny się stać standardem wykonywania tego badania przez ośrodki specjalistyczne — pracownie diagnostyczne i naukowe w naszym kraju. Praca jest wynikiem współpracy wielu specjalistów pracujących w licznych ośrodkach w Polsce, w większości w ośrodkach akademickich. Dokument został przygotowany przez grupy robocze na podstawie polskich oraz zagranicznych opracowań metodologicznych oraz doświadczenia autorów, a następnie poddany ocenie przez grono specjalistów i ekspertów w omawianej dziedzinie. Praca jest adresowana do specjalistów chorób płuc, patomorfologów i diagnostów laboratoryjnych.

Skróty

- BW** (*bronchial washing*) — płukanie oskrzeli — wprowadzenie i odzyskanie pewnej objętości płynu bez konieczności zaklinowania końcówki bronchofiberoskopu w drzewie oskrzelowym
- BAL** (*bronchoalveolar lavage*) — płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe — wprowadzenie około 100–250 ml płynu i odzyskanie około 50–70% objętości podanej, z koniecznością zaklinowania końcówki endoskopu lub cewnika w oskrzelu segmentalnym lub dalszym
- BALF** (*bronchoalveolar lavage fluid*) — płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego

Definicja

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL, *bronchoalveolar lavage*) jest metodą pozyskiwania materiału komórkowego i niekomórkowego z powierzchni nabłonka obwodowych dróg oddechowych, tak zwanej przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. Pierwsze prace nad jej zastosowaniem pochodzą z 1967 roku, chociaż BAL stosowano wcześniej w celach terapeutycznych, zwłaszcza w proteinozie oraz pylicach płuc [1].

Metodyka wykonania BAL

Wskazania

Wskazania do BAL opracowała grupa ekspertów Europejskiego Towarzystwa Oddechowego (ERS, *European Respiratory Society*) oraz Amerykańskiego Towarzystwa Klatki Piersiowej (ATS, *American Thoracic Society*) [2–5].

W Polsce wiele ośrodków potwierdziło wskazania do płukania oskrzelowo-pęcherzykowego [6–15]. Badanie jest wykonywane w celu rozpoznawania różnych chorób płuc, a zwłaszcza ustalenia etiologii zakażeń, diagnostyki chorób śródmiąższowych oraz obwodowych zmian podejrzanych o tło nowotworowe [16–24]. Lecznicze wskazania do płukania oskrzelowo-pęcherzykowego są nieliczne i obejmują zwłaszcza konieczność [25, 26] oczyszczenia dróg oddechowych po inhalacji substancji toksycznych lub usunięcia wydzieliny u chorych na proteinozę.

Szczegółowe opisy wskazań diagnostycznych i leczniczych przedstawiono w tabeli 1.

Należy podkreślić, że badanie płynu z BAL jest narzędziem diagnostycznym w nielicznych schorzeniach, natomiast jest ono niezmiernie przydatne w diagnostyce różnicowej [5, 27–30].

Przeciwwskazania

Przeciwwskazanie bezwzględne stanowi brak zgody pacjenta na wykonanie bronchofiberoskopii lub BAL.

Do przeciwwskazań względnych należą [31–33]:

- hipoksemiczna niewydolność oddechowa $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mm Hg}$;
- cechy ciężkiej obturacji oskrzeli: natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa ($\text{FEV}_{1, \text{forced expiratory volume in 1 second}} < 50\%$ wartości należnej);
 - zwiększają one ryzyko powikłań; wykonywanie badania jest dopuszczalne w specjalistycznych (referencyjnych) ośrodkach, z zachowaniem szczególnej ostrożności;

Tabela 1. Wskazania do płukania oskrzelowo-pęcherzykowego ([30] — modyfikacja własna)

Diagnostyczne

Zakażenia układu oddechowego	— wewnątrzszpitalne — związane z mechaniczną wentylacją — zaburzenia odporności: wrodzone, nabyte, polekowe
Nowotwory	— obwodowe zmiany płucne — rak oskrzelikowo-pęcherzykowy — rozlane zmiany przerzutowe — rozsiew typu <i>lymphangitis carcinomatosa</i>
Ostre uszkodzenie płuc	— choroby śródmiąższowe płuc — choroby zawodowe (pylice, azbestoza, berylioza)
Rozlane zmiany naciekowe	— krwawienie pęcherzykowe — sarkoidoza — proteinoza płucna — histiocytoza — eozynofilowe zapalenie płuc — nacieki polekowe — reakcja odrzucania przeszczepu

Lecznicze

- proteinoza płucna
- inhalacja substancji toksycznych promieniotwórczych
- pyły nieorganiczne (krzemica)
- krwawienie pęcherzykowe
- mukowiscydoza
- w nielicznych przypadkach ciężkiego zaostrzenia astmy oskrzelowej (konieczność usunięcia wydzieliny z obwodowego odcinka dróg oddechowych)

- zaburzenia krzepliwości:
 - wskaźnik Quicka $< 30\%$ lub międzynarodowy współczynnik znormalizowany (INR, *international normalized ratio*) > 2 lub czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*) $> 36 \text{ s}$;
 - małopłytkowość $< 20 \text{ tys./mm}^3$ ($20 \times 10^9/\text{l}$);
- ciężka niewydolność serca [*New York Heart Association* (NYHA III/IV)] z wyjątkiem pacjentów przed przeszczepieniem serca lub płuc;
- ostry zespół wieńcowy;
- mnogie zaburzenia rytmu serca, blok przedsionkowo-komorowy III stopnia;
- rozlane ropne zakażenie dolnych dróg oddechowych (z wyjątkiem osób, u których konieczna jest diagnostyka mikrobiologiczna).

U wszystkich chorych w trakcie każdej bronchoskopii należy monitorować tętno i saturację tlenem za pomocą pulsoksymetru oraz czynność serca z wykorzystaniem kardiomonitora. Konieczne jest zapewnienie możliwości suplementacji tlenu w przypadku obniżenia jego stężenia w trakcie zabiegu, jak również dostępu do sprzętu reanimacyjnego (aparat AMBU, rurki intubacyjne, defibrylator).

Przygotowanie do badania

Bronchofiberoskopia jest badaniem bezpiecznym, możliwym do wykonania w każdej chwili, nawet na sali chorych. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe u większości chorych nie zwiększa ryzyka występowania powikłań, wydłużając czas zabiegu o około 5–10 minut [28].

Przed przystąpieniem do badania powinno się przestrzegać poniższych zasad [31, 34].

1. Należy udzielić pacjentowi wyczerpującej informacji na temat badania i wynikających z niego korzyściach, ewentualnych działaniach niepożądanych i powikłaniach.
2. Pacjent powinien wyrazić pisemną zgodę na badanie (brak zgody jest przeciwwskazaniem do zabiegu). W przypadku dzieci zgodę podpisuje jedno z rodziców lub opiekunów prawnych, dzieci powyżej 14. roku również powinny wyrazić pisemną zgodę na badanie. U chorych nieprzytomnych zgodę powinien wyrazić ordynator oddziału.
3. Przed badaniem pacjent poddawany procedurze nie powinien przyjmować pokarmów (ok. 6 godz.) oraz płynów (ok. 4 godz.).
4. Konieczna jest ocena stanu klinicznego badanego, dlatego należy wykonać:
 - badania podmiotowe i przedmiotowe;
 - następujące badania dodatkowe:
 - pełny koagulogram,
 - spirometrię,
 - saturację lub gazometrię krwi tętnicznej,
 - jonogram,
 - badanie radiologiczne klatki piersiowej w projekcjach standardowych,
 - EKG.
5. Zabezpieczenie dostępu do żyły obwodowej.

Znieczulenie i premedykacja

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe rutynowo wykonuje się w znieczuleniu miejscowym 2-procentową, 4-procentową lub 10-procentową lidokainą (ksylokainą), która jest preparatem bezpiecznym i wykazuje efekt znieczulenia nawet do 60 min [35, 36]. Jej całkowita dawka nie powinna przekroczyć 8,2 mg/kg u dorosłych, co dla pacjen-

ta ważącego 70 kg odpowiada około 30 ml 2-procentowego roztworu. Choć u większości chorych wyżej wymieniona dawka ksylokainy (lidokainy) nie powoduje działań niepożądanych, to jednak należy zachować szczególną ostrożność u pacjentów, u których występuje:

- upośledzona czynność wątroby;
- uszkodzenie mięśnia sercowego i zaburzenia przewodzenia (blok przedsionkowo-komorowy II stopnia, zaawansowany blok wewnątrzkomorowy);
- padaczka lub miastenia;
- włóknienie płuc, astma oskrzelowa.

Ponadto należy zachować szczególną ostrożność u osób w podeszłym wieku (> 70 lat) [37, 38]. W takich przypadkach nie powinno się przekraczać dawki 5 mg/kg.

Najczęstszymi, istotnymi działaniami niepożądanymi są:

- napady drgawkowe;
- zaburzenia rytmu serca;
- uszkodzenie mięśnia sercowego prowadzące do wystąpienia zaburzeń rytmu serca lub nagłego zatrzymania krążenia;
- depresja ośrodka oddechowego prowadząca do zatrzymania oddechu;
- obrzęk śluzówek gardła i krtani.

Inne środki znieczulenia miejscowego, takie jak: kokaina, tetrakaina lub prilokaina, obecnie stosuje się bardzo rzadko. W przypadku konieczności ich użycia nie należy przekraczać dawki kokainy 3 mg/kg masy ciała lub tetrakainy 0,2 mg/kg masy ciała do łącznej dawki 20 mg [39].

Sedacja

U większości chorych świadomość poddania się badaniu endoskopowemu wyzwała objawy lęku i niepokoju, które może złagodzić bezpośrednia rozmowa przed badaniem. Czasami stosuje się krótkodziałające leki uspokajające, zwłaszcza u pacjentów z nadmiernymi objawami zdenerwowania i lęku bądź w przypadku wydłużonego czasu badania. Jednym z najczęściej stosowanych preparatów jest midazolam w średniej dawce 0,07 mg/kg masy ciała (rozpiętość farmakologiczna może się wahać w granicach 0,07–0,67 mg/kg). Wystarczający stopień sedacji można osiągnąć, podając na przykład dożylnie dawkę wstępną 2 mg, a jeżeli jest to konieczne, dodatkowo 1 mg po 2 min. Alternatywnie można zastosować midazolam w dawce 3,25–7,5 mg doustnie na około 30 min przed zabiegiem. Sedacja poprawia tolerancję bronchoskopii, czasami wywołuje niepamięć wsteczną [40]. Szczególną ostrożność należy zachować w przypadku niewydolności oddechowej zwłaszcza

u chorych na POChP, choroby nerwowo-mięśniowe oraz u osób w podeszłym wieku. U niektórych chorych w mechanizmie odruchu wazowagalnego mogą nastąpić: omdlenie, niebezpieczne zaburzenia rytmu serca lub nagłe zatrzymanie krążenia, dlatego w przypadku stosowania sedacji należy bezwzględnie kontrolować zapis krzywej EKG i ciśnienie tętnicze.

W niektórych ośrodkach zaleca się stosowanie atropiny w premedykacji w celu zablokowania odruchów nerwu błędnego, najczęściej w dawce 0,015 mg/kg (łącznie 0,4–0,8 mg, zwykle 0,5 mg — domięśniowo lub podskórnym na 60 min przed badaniem [41–44]. Przeciwwskazania do jej stosowania stanowią: jaskra z wąskim kątem przesączania, niedrożność przewodu pokarmowego, zwężenie odźwiernika, tachykardia oraz utrudnienie oddawania moczu (np. w przypadku przerostu gruczołu krokowego) [45].

W celu sedacji u dzieci stosuje się następujące środki [29, 46]:

- atropina w dawce 0,01 mg/kg (czas trwania 20–30 min);
- midazolam 0,05–0,3 mg/kg (czas trwania 30–120 min);
- ketamina 0,15–0,5 mg/kg (czas trwania 10–20 min).

Zasady przeprowadzenia badania

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe wykonuje się po makroskopowej ocenie drzewa oskrzelowego, przed pobraniem materiału biopsyjnego. Przed płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym często wykonuje się tak zwane płukanie oskrzelowe (BW, *bronchial washing*) [47, 48]. Uzyskany w ten sposób materiał, zwany popłuczynami oskrzelowymi, zawierający wydzielinę i komórki oskrzeli, jest poddawany rutynowej ocenie mikrobiologicznej i cytologicznej. Po płukaniu oskrzelowym bronchofiberoskop jest delikatnie klinowany w wybranym oskrzeli segmentowym/subsegmentowym (należy unikać uszkodzenia pokrywającego go nabłonka). Wybór miejsca płukania jest uzależniony od lokalizacji zmian stwierdzanych w badaniu radiologicznym klatki piersiowej lub w tomografii komputerowej. Należy pobrać płyn z okolicy, w której są widoczne zmiany w badaniu obrazowym [49–53]. W przypadku zmian równomiernie rozsianych zalecanymi miejscami płukania są oskrzela płata środkowego lub języczka [36]. Zaklinowanie końcówki bronchofiberoskopu jest w tych miejscach technicznie najmniej kłopotliwe, a ułożenie pacjenta sprzyja powrotowi płynu pod wpływem siły ciężkości i sprawia, że odzysk jest największy. Następnie, przez kanał roboczy bronchofiberosko-

pu wprowadza się porcjami jałowy, fizjologiczny roztwór chlorku sodowego, ogrzany do temperatury ciała (ok. 37°C). Zapobiega to występowaniu kaszlu i skurczu oskrzeli, mniejsze są zaburzenia czynnościowe układu oddechowego, lepszy jest odzysk płynu bogatego w komórki niż w przypadku użycia płynu w temperaturze pokojowej [54]. Najczęściej podaje się objętość 100–250 ml w porcjach po 20–50 ml z następowym delikatnym odessaniem każdej z nich za pomocą strzykawki, co zapobiega zapadaniu się oskrzeli i zwiększa odzysk [28, 33, 34]. Do odsysania płynu można używać mechanicznego ssania, trzeba jednak zastosować odpowiednie ciśnienie, aby nie uszkodzić nabłonka oskrzelowego i nie spowodować zapadania oskrzeli położonych obwodowo do końcówki bronchofiberoskopu. Odzysk płynu zwiększa się w każdej kolejnej porcji i w sumie powinien wynosić 50–70% pierwotnie podanej objętości [27, 55]. Objętość mniejsza niż 100 ml zawiera zwykle frakcję oskrzelową, a nie pęcherzykową. Przyczynami niezadowolającego odzysku mogą być, obok niewłaściwej techniki wykonywania BAL, znaczna niestabilność oskrzeli i ich zapadanie się nawet przy delikatnym odsysaniu, jak również kaszel występujący podczas badania, podeszły wiek, palenie tytoniu lub pewne procesy chorobowe, jak na przykład rozedma płuc [56, 57]. Z powodu niekorzystnego wpływu lidokainy na żywotność komórek, hodowlę bakteryjną oraz ekspresję niektórych antygenów powierzchniowych, nadmiar zaaplikowanego środka znieczulającego powinno się dokładnie odessać przed podaniem pierwszej porcji płynu [1, 2, 4, 36, 53]. Materiał otrzymany z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego należy umieszczać i przysyłać do dalszej analizy w pojemnikach ze szkła silikowanego lub plastiku propylenowego. W większości ośrodków płyn odzyskany z poszczególnych porcji jest mieszany i do dalszej analizy przesyłany łącznie, w całości [1–5]. W nielicznych ośrodkach każda frakcja jest przesyłana do laboratorium oddzielnie (np. oddzielnie pierwsza i pozostałe porcje) [2]. Zagadnienie mieszania płynu pozostaje w dalszym ciągu przedmiotem dyskusji. Należy jednak zauważyć, że w przypadku istotnych zmian patologicznych (choroba śródmiąższowa, proces nowotworowy, zakażenia) przesłanie materiału w całości nie zmienia, a nawet poprawia jego wartość diagnostyczną.

Uważa się, że w razie potrzeby kolejne badanie BAL można wykonać nie wcześniej niż 72 godziny po poprzednim, ze względu na przejściowy napływ do przestrzeni pęcherzykowej granulocytów obojętnochłonnych i możliwość uzyskania

przez to nieprawidłowych wyników badania cytologicznego [2, 3, 5].

W przypadku wykonania badania u dzieci zaleca się następujące warunki:

- temperatura 0,9% roztworu NaCl do płukania — 37°C [29, 58];
- objętość:
 - 3 ml/kg w 3 dawkach u dzieci do 20 kg;
 - 3 ml/kg w dawkach odpowiednich do masy ciała, po 20 ml u dzieci powyżej 20 kg;
- siła ssania — 3,33–13,3 kPa (25–100 mm Hg);
- prawidłowy odzysk powinien wynosić powyżej 40% podanej objętości.

U dzieci często występuje nieżyt nosa, który powoduje zanieczyszczenie płynu z BAL śluzem (w czasie wprowadzania bronchofiberoskopu zarówno przez nos, jak i przez usta). W celu uniknięcia tego powikłania należy przed zabiegiem dokonać płukania lub odessania zalegającej wydzieliny z nosa i gardła.

Postępowanie po badaniu

Postępowanie po badaniu obejmuje [3–5, 40, 46, 59]:

- zakaz przyjmowania przez badanego pokarmów i płynów przez 60–120 min po zabiegu (czas powrotu skutecznego odruchu połykania);
- przedłużoną — suplementację tlenu u chorych poddanych sedacji oraz z upośledzoną czynnością płuc [60];
- w przypadku zastosowania sedacji: zakaz prowadzenia pojazdów mechanicznych, obsługi maszyn oraz zawierania umów i podpisywania dokumentów o znaczeniu prawnym w ciągu 24 godzin po badaniu;
- udzielenie badanemu informacji o możliwych następstwach związanych z badaniem (gorączka, odkształcenie niewielkiej ilości krwistej płwociny) i sposobie postępowania w przypadku ich wystąpienia.

Powikłania [1, 2, 5, 31, 61]

Do najczęściej występujących powikłań płukania oskrzelowo-pęcherzykowego należą:

- podwyższona temperatura ciała występująca kilka godzin po zabiegu u około 10–30% chorych;
- przemijające pogorszenie wskaźników utlenowania krwi;
- kaszel;
- przemijające zaburzenia czynnościowe układu oddechowego (zmniejszenie FEV₁, szczytowego przepływu wydechowego [PEF, *peak expiratory flow*]);
- trzeszczenia ustępujące samoistnie w ciągu 24–48 godzin, rzadziej świsty i furczenia;

u dzieci zmiany osłuchowe cofają się bardzo szybko w czasie kilku, kilkunastu minut;

- skurcz oskrzeli u chorych na astmę oskrzelową; u dzieci oprócz obturacji oskrzeli częściej obserwuje się skurcz krtani z powodu znacznej jej wrażliwości (po badaniu stosuje się niekiedy metylprednisolon w dawce 1 mg/kg);
- nacieczenie obszaru płuca objętego płukaniem, widoczne w badaniu radiologicznym (zmiany ustępują samoistnie po ok. 72 godz.).

Przekazywanie materiału do laboratorium

Materiał powinno się przekazać do laboratorium niezwłocznie po pobraniu, wskazany jest transport w lodzie. W wyjątkowych sytuacjach dopuszczalne jest jego krótkotrwałe przechowanie w temperaturze +4°C, jednak nie dłużej niż przez okres 30 min [28, 34]. Sposób wykonania i pobierania materiału mają istotne znaczenie dla wiarygodności uzyskanych wyników: oceny składników komórkowych i pozakomórkowych zawartych w materiale pochodzącym z BAL. Dlatego też osoba wykonująca badanie powinna odnotować:

- całkowitą objętość lub objętość poszczególnych frakcji aplikowanego płynu;
- objętość płynu odzyskanego;
- obszar drzewa oskrzelowego poddanego procedurze BAL;
- dane dotyczące pacjenta i jego choroby.

W załączniku 1 przedstawiono wzór skierowania, które powinno zawierać: kolejny numer badania, imię i nazwisko pacjenta, PESEL, numer księgi szpitala, oddział, nazwisko lekarza zlecającego, rozpoznanie wstępne z ewentualnymi uwagami lekarza, między innymi odnośnie wskazań do wykonania badań dodatkowych i uzupełniających, nazwisko osoby wykonującej płukanie, ewentualne uwagi na temat badania bronchofiberoskopowego, z informacją dotyczącą objętości podanego płynu. Dane dotyczące palenia tytoniu powinny być dokładne, to znaczy podane z uwzględnieniem aktualnego palenia, jak również okresu od jego zaprzestania. Bardzo przydatna jest także informacja na temat stosowanego leczenia, zwłaszcza immunosupresyjnego.

Opracowanie materiału z BAL

Poszczególne etapy przedstawiono w tabeli 2.

Postępowanie wstępne [28, 62, 63]

Obróbka materiału w pracowni rozpoczyna się natychmiast po jego dostarczeniu, od wprowadzenia do rejestru pracowni. Konieczne jest odnoto-

Załącznik 1

Pracowania Bronchoskopii	Data
Skierowanie na badanie cytologiczne Płyn z BAL	
Nazwisko i imię.....	ur.
PESEL	
Klinika/Oddział.....	Lekarz kierujący
Rozpoznanie kliniczne	
Palenie papierosów	tak <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> w przeszłości <input type="checkbox"/>
Podejrzenie procesu swoistego	
Miejsce pobrania płynu: języczek — płat środkowy — inne	
Objętość płynu: podanego.....ml, odzyskanego	
UWAGI:	
Lekarz wykonujący badanie	

wanie objętości płynu oraz jego ocena makroskopowa. W warunkach prawidłowych płyn jest przejrzysty, wodnisty, nie zawiera domieszki śluzu w postaci „kożuszka”. Najczęściej spotyka się następujące zmiany wyglądu płynu: krwisty, mętny, opalizujący, o brunatnym zabarwieniu.

Objętość nadesłanego płynu jest wyrażana w mililitrach. Płyn do dalszej obróbki należy umieścić w probówkach ze szkła silikonowanego lub plastiku polipropylenowego. Inne materiały, zwłaszcza o nierównej, chropowatej powierzchni, sprzyjają przyleganiu komórek, szczególnie makrofagów, co istotnie wpływa na zmiany w wynikach ilościowej i jakościowej oceny frakcji komórkowej [34]. Warto nadmienić, że niektóre ośrodki oddzielnie opracowują pierwszą frakcję płynu, jako pochodzącą głównie z oskrzeli, przeznaczając ją zwłaszcza do oceny mikrobiologicznej. Pozostałe frakcje uważane za bardziej reprezentatywne dla dystalnych dróg oddechowych i pęcherzyków płucnych stanowią wówczas źródło materiału do analizy cytologicznej. W piśmiennictwie brakuje jednak przekonujących dowodów na większą wartość diagnostyczną takiego postępowania w porównaniu z łącznym opracowaniem wszystkich uzyskanych frakcji płynu z BAL.

Filtrowanie materiału

Rutynowo zaleca się filtrowanie płynu przez podwójną warstwę gazy nylonowej w celu usunięcia domieszki śluzu. Jest to szczególnie istotne w przypadku materiału pochodzącego od osób palących tytoń, ponieważ umożliwia uzyskanie znacząco lepszej jakości preparatów. Należy jednak pamiętać, że w trakcie procesu filtracji może dochodzić do utraty części materiału komórkowego, szczególnie komórek nowotworowych oraz cząstek i włókien nieorganicznych istotnych w diagnostyce niektórych schorzeń, w tym zawodowych.

Całkowita liczba komórek i ocena ich żywotności [2, 62]

Całkowitą liczbę komórek powinno się liczyć w próbce pobranej z dobrze wymieszanego płynu bezpośrednio po filtracji. Mniej korzystne jest użycie materiału po pierwszym wirowaniu (rutynowo 10 min, 300–500 × g, +4°C) ze względu na istotne straty liczebności i żywotności komórek sięgające do 15–20% komórek po każdym wirowaniu. Zwykle komórki są liczone w komorze Neubauera (lub Burkera). Powszechnie podaje się całkowitą liczbę, mieszczącą się w granicach kilku milionów. Alternatywnie można dodatkowo podać liczbę

Tabela 2. Poszczególne etapy opracowania płynu z BAL

1. Postępowanie wstępne	Pomiar objętości, ocena makroskopowa, odnotowanie obserwacji
2. Filtrowanie	Filtrowanie przez podwójną warstwę gazy
3. Zliczenie całkowitej liczby komórek	Metoda manualna za pomocą hemocytometru
4. Ocena żywotności komórek	Metoda manualna z użyciem błękitu trypanu
5. Przygotowanie preparatów metodą cytowania	Cytospin około 10^5 komórek/preparat Zwykle 1200–2000 rpm przez 10 min Minimum 4 preparaty
6. Wirowanie płynu z BAL	$300\text{--}400 \times g$, 10 min
7. Oddzielenie nadsączy (supernatantu)	Delikatne odciągnięcie nadsączy pipetą Oznakowanie i zamrożenie materiału (4–6 próbek) w temperaturze -70°C (wyjątkowo w temperaturze -20°C)
9. Przygotowanie preparatów do barwienia	Wysuszenie preparatów w temperaturze pokojowej (2 do barwienia MGG i ewentualnie 4–6 do dalszego przechowywania w temp. -20°C) Utrwalenie w alkoholu lub utrwalaczu alkoholowym — 1–2 preparaty
10. Barwienie	2 preparaty — metoda May-Grunwalda-Giemsy (MGG) 1–2 preparaty — hematoksylina i eozyna
11. Ocena preparatów w mikroskopie świetlnym	Ocena jakości preparatów Ocena morfologii komórek, obliczenie wzoru odsetkowego na podstawie policzenia 300 komórek w każdym z dwóch preparatów
12. Barwienia dodatkowe	W zależności od wskazań

komórek w przeliczeniu na ml odzyskanego płynu. Oceny żywotności dokonuje się, obliczając odsetek martwych komórek wybarwionych błękitem trypanu. Żywotność komórek powinno się każdorazowo ocenić i podać jako odsetek żywych komórek. Prawidłowo pobrany i opracowany materiał z BAL cechuje duża żywotność, zwykle ponad 90%.

Przygotowanie preparatów

Powszechnie stosowaną metodą z wyboru do wykonywania preparatów jest cytowanie, które umożliwia szybkie uzyskanie preparatów wysokiej jakości. Metoda ta w niewielkim stopniu zmienia strukturę komórek i pozwala na bardzo dokładną analizę cech morfologicznych, co jest szczególnie przydatne w ocenie populacji komórkowych podlegających *ex vivo* szybkiej apoptozie/nekrozie, na przykład granulocytów kwasochłonnych.

Preparaty należy wykonać niezwłocznie po przefiltrowaniu płynu, wykorzystując cytowirówkę wyposażoną w zamknięty system wirowania materiału. Optymalna gęstość zawiesiny komórkowej umożliwia uzyskanie preparatów zawierających około 10^5 komórek. Krytycznym warunkiem jest zachowanie właściwie dobranych warunków wirowania, co pozwala istotnie ograniczyć wybiórczą utratę limfocytów i uniknąć za-

niżonego odsetka tych komórek w preparatach. Szczegółowe parametry techniczne zależą od aparatury, jaką dysponuje laboratorium i powinny być indywidualnie dobrane (dla najczęściej stosowanych cytowirówek 1200–2000 rpm przez 10 min) [30]. W części laboratoriów wykonanie preparatów jest poprzedzane wirowaniem. Takie postępowanie pogarsza reprezentatywność (większa utrata limfocytów) i jakość preparatów (słabsza adhezja komórek do szkła). Nie zaleca się również wykonywania preparatów cytospinowych z materiału skrwawionego, obecność znaczącej liczby erytrocytów utrudnia wiarygodną ocenę preparatów.

Wyjątkowo, w laboratoriach niedysponujących cytowirówką jest dopuszczalne wykonanie ręcznych rozmazów komórkowych [2, 62]. Pewnymi zaletami tej metody są zachowanie prawie całego składu komórkowego osadu i większa powierzchnia rozmazu dostępnego do oceny morfologicznej komórek. Preparaty ręczne wykonuje się po pierwszym wirowaniu z osadu komórkowego zawieszonoego w $300 \mu\text{l}$ PBS (zbuforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej) bez jonów Ca i Mg o temperaturze $+4^\circ\text{C}$, delikatnie rozprowadzając na szkiełku podstawowym $20 \mu\text{l}$ zawiesiny komórkowej.

Inne techniki, na przykład milipory, są stosowane, chociaż nie jest to technika z wyboru [64].

Opracowanie preparatów

Wskazane jest uzyskanie co najmniej 4 preparatów do oceny rutynowej i co najmniej 2 w celu zabezpieczenia do badań dodatkowych.

Optymalnie należy wykonać:

- 2 preparaty wysuszone w temperaturze pokojowej do barwienia hematologicznego metodą May-Grunwalda-Giemsy (MGG);
- 2 preparaty utrwalone w alkoholu lub utrwalczaczu alkoholowym do barwienia hematoksylina i eozyną (HE);
- 4–6 preparatów wysuszonych w temperaturze pokojowej, przechowywanych w temperaturze co najmniej -20°C ; preparaty należy umieścić w zamrażarce w dniu wykonania, natychmiast po wysuszeniu, aby uniknąć utraty ekspresji antygenów; zamrożone preparaty można wykorzystać do przeprowadzenia barwień immunocytochemicznych, w zależności od wskazań klinicznych; czas przechowywania w zamrożeniu nie jest określony, nie powinien być dłuższy niż pół roku.

Wirowanie

Wirowanie umożliwia rozdzielenie frakcji komórkowej oraz nadsączu. Aby zachować nienaruszoną morfologię komórek, wskazane jest krótkie wirowanie (10 min) w temperaturze 4°C z zastosowaniem niskich obrotów w granicach $300\text{--}500 \times \text{g}$. Nie zaleca się wielokrotnego wirowania i kilkukrotnego płukania komórek ze względu na wspomniany powyżej ubytek ich liczebności oraz żywotności.

Zabezpieczenie nadsączu

W wielu ośrodkach próbki nadsączu zlanego po pierwszym wirowaniu są rutynowo zabezpieczane i przechowywane w temperaturze -70°C (dopuszczalne w temperaturze -20°C), w 4–6 porcjach. Materiał jest przeznaczony głównie do badań naukowych [62, 65, 66].

Ocena preparatów cytologicznych i metody dodatkowe

Ocena preparatów cytologicznych [62, 67, 68]

Ocena płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego jest przykładem specjalistycznego badania cytologicznego i powinna być wykonywana przez osoby wykwalifikowane, posiadające odpowiednie doświadczenie.

Podstawowym badaniem materiału z BAL jest ocena preparatów w mikroskopie świetlnym.

Ocena jakościowa

Preparaty powinny być ocenione w całości zgodnie z zasadami badania cytologii złuszczenio-

wej w powiększeniach z obiektywem $\times 10$ i $\times 20$. Pierwszym etapem jest ocena jakości rozmazu, zwłaszcza określenie domieszki krwinek czerwonych lub komórek nabłonkowych. Stwierdzenie obecności powyżej 5% komórek nabłonka gruczołowego nie pozwala na zakwalifikowanie płynu z BAL jako materiału diagnostycznego z uwagi na zbyt dużą domieszkę frakcji oskrzelowej [2]. Ze względu na znaczną domieszkę erytrocytów, jak również zwiększony odsetek granulocytów obojętnochłonnych (wg autorów ponad 20%) należy kwalifikować materiał z dużą ostrożnością, szczególnie w diagnostyce chorób śródmiąższowych. Taki materiał może się kwalifikować do diagnostyki zakażeń i nowotworów.

Celem oceny całości preparatu jest wstępne określenie dominującej populacji komórek. Skład komórkowy płynu z BAL jest stały. Obecne są: makrofagi, limfocyty, granulocyty obojętnochłonne i granulocyty kwasochłonne (wynik badania, załącznik 2). Dokładne przejrzanie preparatu pole po polu umożliwia:

- identyfikację elementów pozakomórkowych, na przykład składników mineralnych lub drobnoustrojów; prawidłowo pobrany i opracowany płyn z BAL jest jałowy i obecność jakichkolwiek drobnoustrojów świadczy o zakażeniu oraz może stanowić wskazanie do dalszych badań specjalistycznych (badania mikrobiologiczne).
- wykrycie innych typów komórek niż podstawowe, zwłaszcza komórek z cechami atypii i nowotworowych; w polskich pracowniach patomorfologii preparaty cytologiczne rutynowo są barwione hematoksylina i eozyną; takie barwienie umożliwia między innymi dokładną ocenę morfologii jądra komórkowego oraz rozpoznawanie i różnicowanie komórek nowotworowych, dlatego zaleca się wykonanie co najmniej jednego preparatu barwionego hematoksylina i eozyną.

Ocena ilościowa [3, 28, 30, 62, 69]

Ocena ilościowa wymaga dokładnej identyfikacji komórek, co jest możliwe w barwieniu hematologicznym MGG, w dużym powiększeniu (obiektyw $\times 100$) z zastosowaniem immersji. Barwienie MGG jest metodą z wyboru. Wykorzystano ją między innymi do ustalenia normy składu odsetkowego płynu z BAL. Stosowanie jednolitej metodyki barwienia umożliwia również porównywanie wyników między pracowniami. Zastosowanie innych metod oceny frakcji komórkowych, na przykład cytometrii przepływowej, może prowadzić do zawyżenia odsetka limfocytów [70].

Załącznik 2

Nazwa pracowni	Data
Wynik badania płynu z BAL nr	
Nazwisko, imię
PESEL
Rozpoznanie kliniczne
Wygląd makroskopowy.....	objętość.....ml
	Norma
Liczba komórek $\times 10^6$	$< 10 \times 10^6$
Żywotność komórek	%
Makrofagi	$> 80\%$
Limfocyty	$< 15\%^*$
Granulocyty obojętnochłonne	$< 3\%$
Granulocyty kwasochłonne	$< 0,5\%$
Drobnooustroje	
Komórki nowotworowe	
Opis i wnioski	
*Ocena subpopulacji CD4, CD8 po uzgodnieniu	
	Norma
Limfocyty	%
Limfocyty CD4+	%
Limfocyty CD8+	%
CD4+/CD8+	1,5–2,0
Podpis	

W celu obliczenia wzoru odsetkowego BALF należy wybrać kilka przypadkowych pól (najlepszej jakości) i policzyć 300–500 komórek, korzystając z licznika hematologicznego [34, 62, 71]. W preparatach cytopspinowych zaleca się liczenie koncentryczne do środka preparatu [72]. W analizie ilościowej należy brać pod uwagę komórki, których morfologia nie budzi wątpliwości i pozwala na prawidłowe zakwalifikowanie [73]. Nie wydaje się konieczne rutynowe podawanie całkowitej, bezwzględnej liczby poszczególnych komórek, jeżeli jednak wartość ta zdecydowanie odbiega od normy, należy zwrócić uwagę na ten fakt przy opisie wyniku i formułowaniu wniosku.

Ocena fenotypu komórek

W rutynowej praktyce znajduje zastosowanie ocena odsetka limfocytów CD4+ i CD8+ z wyliczeniem stosunku CD4/CD8 [2]. W szczególnych przypadkach podejrzenia rozrostu chłonnego celowe może być zastosowanie markerów limfocytów B (CD19, CD20). Ocena odsetka komórek prezentujących antygen CD1a ma zastosowanie w diagnostyce płucnej postaci ziarniniakowości Lan-

gerhansa. Ocenę fenotypu wykonuje się na zlecenie klinicysty lub po ewentualnym wskazaniu celowości tego badania przez osobę oceniającą płyn z BAL. W niektórych pracowniach badanie wykonuje się rutynowo w każdym przypadku, gdy limfocytoza przekracza 20% [62]. Wiarygodny wynik można uzyskać przy limfocytozie $> 15\%$ przy zastosowaniu metody immunocytochemicznej, a w przypadku cytometrii przepływowowej w zasadzie bez ograniczeń co do odsetka limfocytów [70].

Barwienia immunocytochemiczne i ocena preparatów w mikroskopie są metodami z wyboru. Reakcje przeprowadza się w dniu badania lub w preparatach przechowywanych w temperaturze -20°C . Odsetek komórek, w których zaszła wyraźna reakcja dodatnia, ocenia się, zliczając łącznie co najmniej 200 komórek danego typu (np. limfocytów). Pomocne może być odnotowanie intensywności reakcji [np. (+) — słabo dodatnia, (++) — wyraźnie dodatnia, (+++) — silnie dodatnia]. Należy pamiętać o reakcjach nieswoistych (np. małe makrofagi mogą wykazywać ekspresję CD4) [74].

Technika cytometrii przepływowowej nie jest rutynową metodą diagnostyczną, chociaż jest coraz

powszechniej stosowana w badaniach naukowych. Zawiesina komórkowa po odwirowaniu płynu zawiera zwykle około kilka milionów komórek i kwalifikuje się do badania metodą cytometrii, podobnie jak krew żylna [70, 75, 76].

Badania mikrobiologiczne

Istotnym wskazaniem klinicznym do badania płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego jest diagnostyka mikrobiologiczna. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe jest badaniem z wyboru u chorych z zaburzeniami odporności [4, 77–79]. Jest ono bezpieczniejsze w porównaniu z technikami biopsyjnymi, może być wykonane u chorych z małą liczbą płytek i granulocytów. Znajduje również zastosowanie w diagnostyce zapaleń płuc, szczególnie u chorych w ciężkim stanie, w trakcie mechanicznej wentylacji [80, 81]. Miejsce wykonania płukania powinno się wybrać w zależności od obrazu radiologicznego. Nie wypracowano odrębnych zasad opracowania płynu w przypadku diagnostyki mikrobiologicznej [19]. Należy wykonać typową diagnostykę cytologiczną oraz zaplanować jak najszerze badania mikrobiologiczne, pozwalające rozpoznać zakażenia o różnej etiologii. Takie postępowanie jest uzasadnione koniecznością diagnostyki różnicowej zmian naciekowych, które u chorych z obniżoną odpornością mogą mieć różny i niekiedy złożony charakter [4, 19, 62, 78].

W preparatach rutynowo barwionych MGG można stwierdzić obecność (lub jej cechy pośrednie) takich drobnoustrojów, jak grzyby, cechy zakażenia niektórymi wirusami (HPV, CMV), pośrednie cechy obecności *P. jiroveci* [62, 82]. Dokładną diagnostykę mikrobiologiczną powinno się wykonać w specjalistycznej pracowni według obowiązujących zasad badań mikrobiologicznych. Jeżeli drobnoustroje zostaną wykryte przypadkowo, należy to odnotować w wyniku badania i zalecić badanie mikrobiologiczne. Do typowych przykładów rutynowo stosowanych barwień dodatkowych w diagnostyce mikrobiologicznej płynu z BAL należy barwienie metodą Ziehl-Neelsen (rozpoznawanie gruźlicy) lub Gomori-Grocott (identyfikacja grzybów, pasożytów) [19, 62, 83, 84]. Nie ma ustalonych norm rozpoznania zakażenia bakteryjnego. Uważa się, że podobnie jak w innych płynach ustrojowych, wartość powyżej 10^4 – 10^5 kolonii na ml przemawia za infekcją, a nie kontaminacją [19]. W licznych badaniach potwierdzono znaczenie badania BAL w diagnostyce gruźlicy i mykobakterioz [83, 84].

Barwienia dodatkowe

Barwienia dodatkowe stosowane w diagnostyce histopatologicznej mogą mieć zastosowanie w wybranych przypadkach badania płynu z BAL, na przykład: — barwienie PAS (*periodic acid Schiff*) — diagnostyka proteinozy;

- barwienie Perls lub błękitem toluidyny w kierunku obecności żelaza — diagnostyka krwawienia wewnątrzpęcherzykowego;
- barwienie w kierunku nieswoistej esterazy — różnicowanie niedojrzałych form makrofagów i dużych limfocytów w ocenie aktywności sarkoidozy [28];
- specjalne techniki badań chemicznych w diagnostyce pylic i chorób zawodowych układu oddechowego.

Badanie składników nadsącza płynu z BAL

Badanie składników nadsącza uzyskanego po odwirowaniu płynu z BAL nie ma istotnego zastosowania w diagnostyce rutynowej, natomiast jest wykorzystywane w badaniach poznawczych. Opracowano standardy badania i zakresy norm stężenia substancji rozpuszczalnych [2, 65, 66].

Wpływ czynników zewnętrznych na wynik badania płynu z BAL

Na wynik badania mogą mieć wpływ czynniki demograficzne oraz środowiskowe.

Nie udowodniono wpływu wieku i rasy, poza zmniejszeniem stosunku CD4/CD8, obserwowanym u osób starszych [3], chociaż obserwowano zjawisko odwrotne — zwiększenie odsetka limfocytów CD4 u tych starszych osób [85]. Skład komórkowy BALF od zdrowych dzieci jest zbliżony do wyników uzyskanych u osób dorosłych [86, 87].

Niezwykle istotny jest wpływ palenia tytoniu [62, 88, 89]. Brunatne zabarwienie płynu z BAL wskazuje na pochodzenie od czynnego palacza tytoniu. Pyły papierosowe są bardzo dobrze widoczne w barwieniu MGG w postaci drobin różnej wielkości i o różnym wysyceniu. U osób palących zwiększa się również całkowita liczba komórek, około 2-krotnie w stosunku do normy (tab. 3). Wynika to ze znaczącego wzrostu liczby makrofagów. Zwiększony odsetek makrofagów powoduje relatywne zmniejszenie odsetka limfocytów. Warto podkreślić, że większa cytoza, ponad 30 milionów komórek może odpowiadać zapaleniu oskrzelików i/lub postaci choroby śródmiąższowej związanej z paleniem [90]. Typową zmianą związaną z paleniem jest zmniejszenie stosunku CD4/CD8, wynikające ze zwiększenia odsetka limfocytów CD8+ [91, 92]. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe uzyskane od czynnych osób palących tytoń charakteryzuje się ponadto zwiększeniem liczby granulocytów, zarówno obojętno-, jak i kwasochłonnych. W wyniku badania należy odnotować zmiany związane z paleniem nawet wówczas, gdy brakuje danych na ten temat w skierowaniu. Wpływ dymu tytoniowego może bowiem w sposób istotny zmie-

Tabela 3. Porównanie wyniku składu komórkowego płynu z BAL od zdrowych osób palących tytoń i niepalących (wg [3, 62, 92])

	Osoby zdrowe niepalące	Osoby zdrowe palące tytoń
Całkowita liczba komórek [$\times 10^6$]	10	20
Makrofagi (%)	> 80	> 90
Limfocyty (%)	< 15	< 10
Granulocyty obojętne (%)	< 3	< 3
Granulocyty kwasochłonne (%)	< 0,5	< 0,5
Stosunek odsetka limfocytów CD4+/CD8+	1,5–2,5	0,5–1,5

niać skład płynu i prowadzić do błędnych wyników badania, na przykład w sarkoidozie [93, 94].

W analizie wyników badania należy brać pod uwagę stosowanie leków, szczególnie tych o działaniu immunomodulującym, oraz czas trwania ostrego stanu zapalnego w drogach oddechowych [95, 96].

Protokół badania

Sposób opisu wyniku badania płynu z BAL przedstawiono w załączniku 2.

W wyniku poza przedstawieniem wartości liczbowych należy:

- zaznaczyć obecność komórek nieprawidłowych, zwłaszcza nowotworowych, i wskazać konieczność weryfikacji rozpoznania przez patomorfologa;
- opisać szczególne formy komórek nienabłonkowych, na przykład makrofagów z uwzględnieniem rodzaju pyłów wypełniających ich cytoplazmę (papierosowe, pylicze, barwniki żółciowe, hemosyderyna, lipidy);
- odnotować obecność drobnoustrojów;
- opisać wszelkie inne nieprawidłowe składniki płynu, na przykład składniki mineralne, zwłaszcza włókna azbestu.

Konieczne jest podsumowanie wyniku, które należy odnieść do rozpoznania klinicznego. Wynik powinien być odpowiedzią na pytanie zawarte w skierowaniu.

BAL w badaniach naukowych [1, 2, 4, 5, 97]

Niniejsze opracowanie dotyczy oceny płynu z BAL jako elementu rutynowej diagnostyki klinicznej. Nie przedstawiono tu szczególnych metod stosowanych w badaniach poznawczych, w których bywają stosowane i dopuszczalne modyfikacje badania. Płyn z BAL stanowi bardzo cenny materiał, szczególnie dla oceny patogenezы wielu chorób, a także wpływu czynników zewnętrznych

na układ oddechowy. Pozyskiwanie wielu milionów żywych komórek pozwala na badanie ich morfologii, fenotypu, czynności, stężeń wydzielanych przez nie substancji. Ponadto hodowle komórek z płynu z BAL służą poznaniu wielu procesów zachodzących w drogach oddechowych. Cennej informacji dostarcza pomiar substancji rozpuszczalnych w nadsączu po odwirowaniu komórek, chociaż wyniki badań różnią się niekiedy między ośrodkami. W celu obiektywizacji wyników niekiedy zaleca się przeliczanie stężeń substancji w stosunku do zawartości białka lub mocznika [2, 66].

W każdym przypadku wykonania badania, także w celach poznawczych, zaleca się przeprowadzenie kolejnych etapów rutynowej oceny płynu oraz opracowanie i przedstawienie typowego wyniku badania. Prawidłowo wykonany BAL pozwala na uzyskanie wystarczającej objętości płynu, który można wykorzystać równocześnie do celów diagnostycznych i badawczych.

Podziękowania

Autorzy składają podziękowania za cenne uwagi i pomoc w redagowaniu niniejszych Wskaźników następującym osobom:

Prof. dr hab. n. med. Michał Pirożyński
Pracownia Badań Endoskopowych Układu Oddechowego, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Dr n. med. Juliusz Bokiej
Oddział Pulmonologiczny z Pododdziałem Alergologicznym, SPZOZ Szpital Wojewódzki w Jeleniej Górze

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Chyczewska
Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Prof. dr hab. n. med. Hanna Grubek-Jaworska
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Dr n. med. Piotr Kopiński
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Dr n. med. Rafał Krenke
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Dr hab. n. med. Robert Mróz
Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Śladek
II Katedra Chorób Wewnętrznych, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Prof. dr hab. n. med. Dariusz Ziara
Katedra i Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy, Śląski Uniwersytet Medyczny w Zabrzu

Piśmiennictwo

- Reynolds H.Y. Use of bronchoalveolar lavage in humans-past necessity and future imperative. *Lung* 2000; 178: 271–293.
- Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur. Respir. J.* 1989; 2: 561–85.
- Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: S169–S202.
- Klech H., Hutter C., Costabel U. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): raport of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur. Respir. Rev.* 1992; 8: 47–127.
- Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur. Respir. J.* 1990; 3: 937–976.
- Chlap Z., Owsiński J. Możliwości i ograniczenia płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) w cytologicznej ocenie zmian śródmiąższowych w płucach. *Pol. Tyg. Lek.* 1989; 44: 63–67, 72.
- Domagała-Kulawik J., Dąbrowski A., Droszcz W. Płukania oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) w diagnostyce pulmonologicznej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1987; 77: 116–122.
- Domagała-Kulawik J., Hoser G., Kawalec M., Doboszyńska A., Kawiak J., Droszcz W. Lymphocyte phenotyping in systemic sclerosis: a flow cytometry analysis of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1997; 19: 264–270.
- Firlik M., Sikora J. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe u chorych na sarkoidozę płuc z I' zaawansowania zmian radiologicznych. *Pneumonol. Pol.* 1990; 58: 365–359.
- Lasota A., Grubek-Jaworska H., Barliński J., Droszcz W. Wartość diagnostyczna płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) w różnych chorobach układu oddechowego. *Pol. Tyg. Lek.* 1988; 43: 674–680.
- Plusa T., Bejm J., Józefczak E., Swierz J., Drzewiecki Z. Stężenia antygeny karcynembrionalnego w surowicy i materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u chorych na raka płuca. *Pneumonol. Pol.* 1989; 57: 277–282.
- Plusa T. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe u chorych na astmę oskrzelową. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1991; 59: 7–15.
- Zajączkowska J., Roszkowski W. Wstępna ocena przydatności diagnostycznej płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Wyniki wstępne. *Pneumonol. Pol.* 1987; 55: 190–193.
- Zaleska J., Pirożyński M., Sokolnicka I. i wsp. Rola BAL w podejmowaniu decyzji o leczeniu chorych na sarkoidozę. *Pneumonol. Pol.* 1990; 58: 167–172.
- Zielonka T.M., Rybus L., Lasota A., Droszcz W. Przydatność płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w rozpoznawaniu gruźlicy płuc. Opis przypadku. *Pneumonol. Pol.* 1990; 58: 634–638.
- Ziora D., Oklek K. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) u chorych na sarkoidozę płuc. Część II. Zmiany w składzie komórkowym BAL i wyniki badań czynnościowych u chorych na sarkoidozę leczonych prednisonem. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1993; 61: 159–165.
- Ziora D., Oklek K. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) u chorych na sarkoidozę płuc. Część I. Próba korelacji składu komórkowego BAL z obrazem radiologicznym i badaniami czynnościowymi płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1993; 61: 152–158.
- Zajączkowska J., Meleniewska-Maciszewska A., Derentowicz P. i wsp. Wstępna ocena diagnostycznego znaczenia płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) w wybranych przypadkach śródmiąższowych chorób płuc. *Pneumonol. Pol.* 1989; 57: 92–99.
- Ramirez P., Valencia M., Torres A. Bronchoalveolar lavage to diagnose respiratory infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28: 525–533.
- Plusa T., Pirożyński M., Piechota W. Aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I w surowicy i materiale z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u chorych na sarkoidozę i raka płuca. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1991; 59: 8–12.
- Pirożyński M. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of peripheral, primary lung cancer. *Chest* 1992; 102: 372–374.
- Dąbrowski A., Droszcz W., Grubek-Jaworska H., Lasota A., Barliński J., Wałajts-Rode E. Obraz kliniczny i zmiany w BAL u chorych z płucem hodowców ptaków po prowokacji alergowej. *Pol. Tyg. Lek.* 1988; 43: 669–673.
- Chciałowski A., Plusa T., Jahnz-Różyk K., Kalczak M. Próba analizy cytologicznej materiału z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) u chorych na zapalenie oskrzeli (badania wstępne). *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1992; 60: 16–21.
- Ziora D., Oklek K., Niepsuj G., Kieda-Szurkowska J., Jastrzębski D., Dutkiewicz J. Skład komórkowy BAL i czynność płuc u chorych na przewlekłe alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1992; 60: 9–15.
- Bielecki M., Młynarczyk W. Proteinoza pęcherzyków płucnych, problem diagnostyczny. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1997; 65: 77–80.
- Danel C., Israel-Biet D., Costabel U., Klech H. Therapeutic applications of bronchoalveolar lavage. *Eur. Respir. J.* 1992; 5: 1173–1175.
- Wood-Baker R., Burdon J., McGregor A., Robinson P., Seal P. Fibre-optic bronchoscopy in adults: a position paper of The Thoracic Society of Australia and New Zealand. *Intern. Med. J.* 2001; 31: 479–487.
- Baughman R.P. Bronchoalveolar Lavage. Year Book, Mosby 1992.
- Midulla F., de Blic J., Barbato A. i wsp. Flexible endoscopy of paediatric airways. *Eur. Respir. J.* 2003; 22: 698–708.
- Meyer K.C. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28: 546–560.
- Klech H., Hutter C. Side-effects and safety of BAL. *Eur. Respir. J.* 1990; 3: 939.
- Pirożyński M. Bronchofiberoskopia w Oddziale Intensywnej Terapii. Fundcja na Rzecz Bezpiecznego Znieczulenia, 2002.
- Rennard S.I., Aalbers R., Bleecker E., Klech H., Rosenwasser L., Olivieri D., Sibille Y. Bronchoalveolar lavage: performance, sampling procedure, processing and assessment. *Eur. Respir. J.* 1998; 26 (supl.): 13S–15S.
- Baughman R.P. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28: 475–485.
- Loukides S., Katsoulis K., Tsarpalis K., Panagou P., Kalogeropoulos N. Serum concentrations of lignocaine before, during and after fiberoptic bronchoscopy. *Respiration* 2000; 67: 13–17.
- Pirożyński M. Bronchofiberoskopia. α -medica press, Bielsko-Biała 1999.
- Kato H., Goto H., Yuasa K., Ieki R., Shimada K. Lidocaine concentrations in endobronchial aspirates during flexible fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 1989; 96: 700.
- Mcalpine L.G., Thomson N.C. Lidocaine-induced bronchoconstriction in asthmatic patients. Relation to histamine airway responsiveness and effect of preservative. *Chest* 1989; 96: 1012–1015.
- Tham E.J., Morris S., Wright E.M., Campbell I.A., Mapleson W.W. An assessment of prilocaine as a topical anaesthetic agent for fiberoptic bronchoscopy in comparison with lidocaine. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1994; 38: 442–447.
- Chhajed P.N., Wallner J., Stolz D. i wsp. Sedative drug requirements during flexible bronchoscopy. *Respiration* 2005; 72: 617–621.
- Hewer R.D., Jones P.M., Thomas P.S., McKenzie D.K. A prospective study of atropine premedication in flexible bronchoscopy. *Aust. N. Z. J. Med.* 2000; 30: 466–469.
- Cowl C.T., Prakash U.B., Kruger B.R. The role of anticholinergics in bronchoscopy. A randomized clinical trial. *Chest* 2000; 118: 188–192.
- Grahmann P.R., Schoder A., Warzelhan J., Zehender M., Hasse J. Bronchoscopy and rhythmic disorders. Premedication with atropine-sulfate, as a rule? *Pneumologie* 2002; 56: 593–598.
- Williams T., Brooks T., Ward C. The role of atropine premedication in fiberoptic bronchoscopy using intravenous midazolam sedation. *Chest* 1998; 113: 1394–1398.
- Triller N., Debeliak A., Koceli P. Topical anesthesia with lidocaine and the role of atropine inflexible bronchoscope. *J. Bronchol.* 2004; 11: 242–245.
- Berkenbosch J.W., Graff G.R., Stark J.M. Safety and efficacy of ketamine sedation for infant flexible fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 2004; 125: 1132–1137.
- Thompson A.B., Daughton D., Robbins R.A., Ghafouri M.A., Oehlerking M., Rennard S.I. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140: 1527–1537.
- Thompson A.B., Huerta G., Robbins R.A. i wsp. The bronchitis index. A semiquantitative visual scale for the assessment of airways inflammation. *Chest* 1993; 103: 1482–1488.
- Ziora D., Grzanka P., Mazur B., Niepsuj G., Oklek K. BAL z dwóch różnych segmentów płuc wskazanych badaniem tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (HRCT) u chorych na sarkoidozę. Część I. Ocena homogenności procesu *alveolitis* i przydatności HRCT w wyborze miejsca do BAL. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1999; 67: 422–434.

50. Ziora D., Grzanka P., Niepsuj G., Mazur B., Oklek K. BAL z dwóch różnych segmentów płuc wskazanych badaniem tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (HRCT) u chorych na sarkoidozę. Część III. Korelacje pomiędzy badaniami czynnościowymi a rozległością zmian w HRCT oraz parametrami komórkowymi BAL. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1999; 67: 443–451.
51. Costabel U., Guzman J., Bonella F., Oshimo S. Bronchoalveolar lavage in other interstitial lung diseases. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28: 514–524.
52. Drent M., Mansour K., Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28: 486–495.
53. Chciałowski A. Wartość płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2003; 71: 464–470.
54. Burns D.M., Shure D., Francoz R. i wsp. The physiologic consequences of saline lobar lavage in healthy human adults. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983; 127: 695–701.
55. Schildge J., Nagel C., Grun C. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases: does the recovery rate affect the results? *Respiration* 2007; 74: 553–557.
56. Lofdahl J.M., Cederlund K., Nathell L., Eklund A., Skold C.M. Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur. Respir. J.* 2005; 25: 275–281.
57. Lusuardi M., Capelli A., Cerutti C.G., Spada E.L., Donner C.F. Airways inflammation in subjects with chronic bronchitis who have never smoked. *Thorax* 1994; 49: 1211–1216.
58. de Blic J., Midulla F., Barbato A. i wsp. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. *European Respiratory Society. Eur. Respir. J.* 2000; 15: 217–231.
59. Fal A.M., Pawłowicz R. Istotność badania popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych w diagnostyce internistycznej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2006; 116: 694–702.
60. Pirożyński M., Sliwinski P., Zielinski J. Effect of different volumes of BAL fluid on arterial oxygen saturation. *Eur. Respir. J.* 1988; 1: 943–947.
61. British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax* 2001; 56 (supl. 1): i1–21.
62. Costabel U. *Atlas of Bronchoalveolar Lavage*. Chapman and Hall Medical, 1998.
63. Stanley M.W., Henry-Stanley M.J., Iber C. *Bronchoalveolar Lavage: Cytology and Clinical Applications*. Igaku-Shoin, 1991.
64. Taskinen E., Tukiainen P., Renkonen R. Bronchoalveolar lavage. Influence of cytologic methods on the cellular picture. *Acta. Cytol.* 1992; 36: 680–686.
65. Chciałowski A. Ocena makroskopowa i immunobiochemiczna stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych przy wykorzystaniu techniki bronchofibroskopowej. CSK WAM, 1992.
66. Haslam P.L., Baughman R.P. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur. Respir. J.* 1999; 14: 245–248.
67. Domagała-Kulawik J. Trudności interpretacyjne w ocenie rozmazów komórkowych BAL i płwociny indukowanej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2007; 75: 261–267.
68. Domagała-Kulawik J., Olszewski W.T. *Atlas Cytopatologii Układu Oddechowego. α-medica press, Bielsko-Biała* 2009.
69. Merchant R.K., Schwartz D.A., Halmers R.A., Dayton C.S., Hunninghake G.W. Bronchoalveolar lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146: 448–453.
70. Kopiński P., Szczeklik J., Lackowska B. i wsp. Flow cytometric characteristics of alveolar lymphocytes (AL) obtained from the control group — proposal of normal value range of AL subsets in nonsmokers. *Central Eur. J. Immunol.* 2004; 29: 1–10.
71. De Brauwier E.I., Jacobs J.A., Nieman F., Bruggeman C.A., Drent M. Bronchoalveolar lavage fluid differential cell count. How many cells should be counted? *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2002; 24: 337–341.
72. De Brauwier E.I., Drent M., Mulder P.G., Bruggeman C.A., Wagenaar S.S., Jacobs J.A. Differential cell analysis of cytocentrifuged bronchoalveolar fluid samples affected by the area counted. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2000; 22: 143–149.
73. Chu P., Weiss L. *Modern Immunohistochemistry*. Cambridge University Press, 2009.
74. Lohmeyer J., Friedrich J., Rosseau S., Pralle H., Seeger W. Multiparameter flow cytometric analysis of inflammatory cells contained in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Immunol. Methods* 1994; 172: 59–70.
75. Dauber J.H., Wagner M., Brunsvold S., Paradis I.L., Ernst L.A., Waggoner A. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid: comparison of a two-color technique with a standard immunoperoxidase assay. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 7: 531–541.
76. Jain P., Sandur S., Meli Y., Arroliga A.C., Stoller J.K., Mehta A.C. Role of flexible bronchoscopy in immunocompromised patients with lung infiltrates. *Chest* 2004; 125: 712–722.
77. Kahn F.W., Jones J.M. Analysis of bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients with a protocol applicable in the microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1150–1155.
78. Zajączkowska J., Zalewska-Schonhaler N., Mussabir M. i wsp. Rola bronchoskopii z płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym w rozpoznawaniu gruźlicy u chorych na AIDS. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1995; 63: 27–31.
79. Ioanas M., Ferrer R., Angrill J., Ferrer M., Torres A. Microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Eur. Respir. J.* 2001; 17: 791–801.
80. Fagon J.Y. Diagnosis and treatment of ventilator-associated pneumonia: fiberoptic bronchoscopy with bronchoalveolar lavage is essential. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 27: 34–44.
81. Knox K.S., Meinke L. Role of bronchoalveolar lavage diagnostics in fungal infections. *Clin. Chest. Med.* 2009; 30: 355–365.
82. Nowacka-Mazurek M., Krenke R., Grubek-Jaworska H., Walkiewicz R., Safianowska A., Chazan R. Mikobakteriozy płuc — trudności diagnostyczne na podstawie doświadczeń własnych. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006; 74: 84–88.
83. Grubek-Jaworska H., Walkiewicz R., Safianowska A. i wsp. Nontuberculous mycobacterial infections among patients suspected of pulmonary tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 28: 739–744.
84. Meyer K.C., Soergel P. Variation of bronchoalveolar lymphocyte phenotypes with age in the physiologically normal human lung. *Thorax* 1999; 54: 697–700.
85. Midulla F., Villani A., Merolla R., Bjermer L., Sandstrom T., Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr. Pulmonol.* 1995; 20: 112–118.
86. Riedler J., Grigg J., Stone C., Tauro G., Robertson C.F. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 163–168.
87. Ratjen F., Bredendiek M., Brendel M., Meltzer J., Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur. Respir. J.* 1994; 7: 1865–1870.
88. Mancini N.M., Bene M.C., Gerard H. i wsp. Early effects of short-time cigarette smoking on the human lung: a study of bronchoalveolar lavage fluids. *Lung* 1993; 171: 277–291.
89. Skold C.M., Lundahl J., Hallden G., Hallgren M., Eklund A. Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1996; 106: 108–113.
90. Domagała-Kulawik J. BAL in the diagnosis of smoking-related interstitial lung diseases: Review of literature and analysis of our experience. *Diagn. Cytopathol.* 2008; 36: 909–915.
91. Costabel U., Bross K.J., Reuter C., Ruhle K.H., Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 90: 39–44.
92. Hoser G., Kawiak J., Domagała-Kulawik J., Kopiński P., Droszcz W. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 1999; 37: 25–30.
93. Drent M., van Velzen-Blad H., Diamant M., Hoogsteden H.C., van den Bosch J.M. Relationship between presentation of sarcoidosis and T lymphocyte profile. A study in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1993; 104: 795–800.
94. Leuenberger P., Vonmoos S., Vejdovsky R. Morphologic changes of alveolar macrophages in smoking sarcoidosis patients. *Eur. J. Respir. Dis.* 1985; 139 (supl.): 72–75.
95. Meduri G.U., Headley S., Tolley E., Shelby M., Stentz F., Postlethwaite A. Plasma and BAL cytokine response to corticosteroid rescue treatment in late ARDS. *Chest* 1995; 108: 1315–1325.
96. Meduri G.U., Kohler G., Headley S., Tolley E., Stentz F., Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 1995; 108: 1303–1314.
97. Rose A.S., Knox K.S. Bronchoalveolar lavage as a research tool. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28: 561–573.