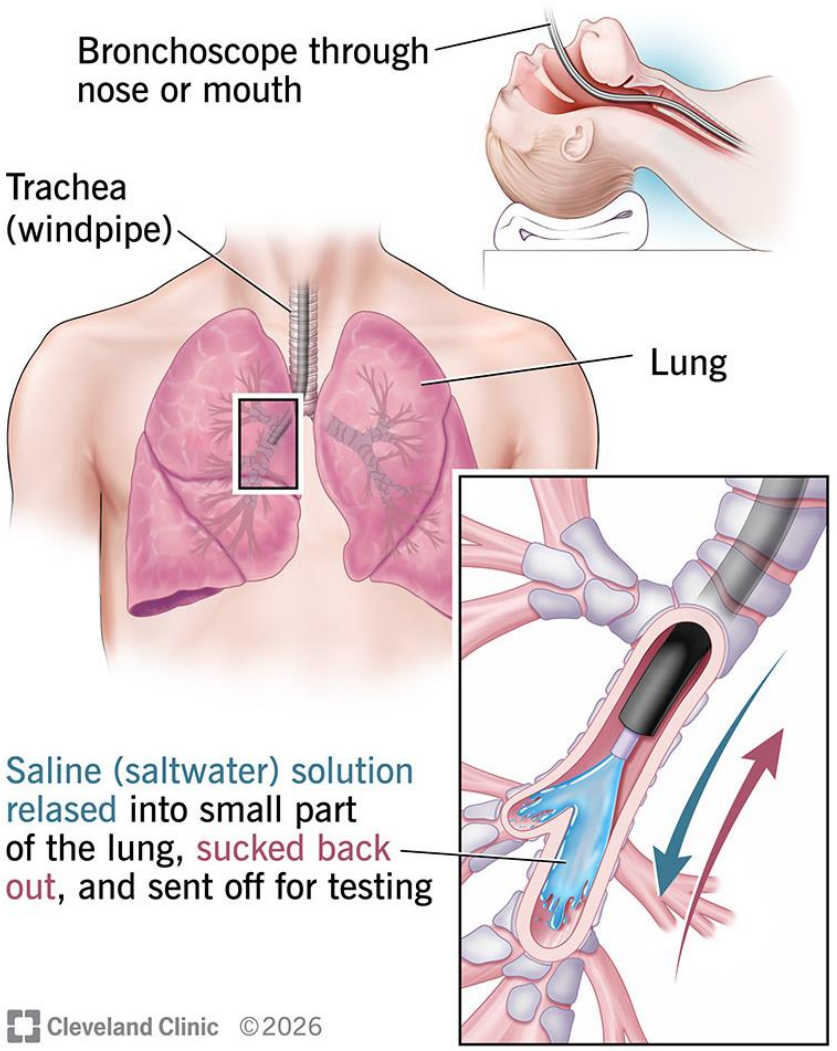
Přínos průtokové cytometrie ve vyšetření BAL

H. Hudečková
Laboratoř klinické imunologie a alergologie
Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín
hana.hudeckova@lab.agel.cz

Bronchoalveolární laváž (BAL)

Miniinvazivní diagnostická metoda prováděná v rámci **bronchoskopického vyšetření**, při které se provádí cílený **výplach plicního segmentu** fyziologickým roztokem. Jeho zpětným nasátím získáme **vzorek tekutiny z dolních dýchacích cest a plicních sklípků** pro následný laboratorní rozbor.



Bronchoalveolární laváž (BAL)

Výhody metody:

- nenáročná
- šetrná
- bezpečná

Vhodná pro:

- diagnostiku plicního onemocnění
- posouzení jeho aktivity
- sledování efektivity léčby



MUDr. Ľubomír Leškovský - primář oddělení pneumologie a ftizeologie Nemocnice AG EL Nový Jičín a. s při vyšetření pacientky

Krok za krokem: Postup výkonu

1. Zavedení flexibilního bronchoskopu a jeho zaklínění do ústí vybraného bronchu

2. Instilace fyziologického roztoku o teplotě 37 °C v několika porcích, standardně 3 až 5 porcí po 40- 50 ml



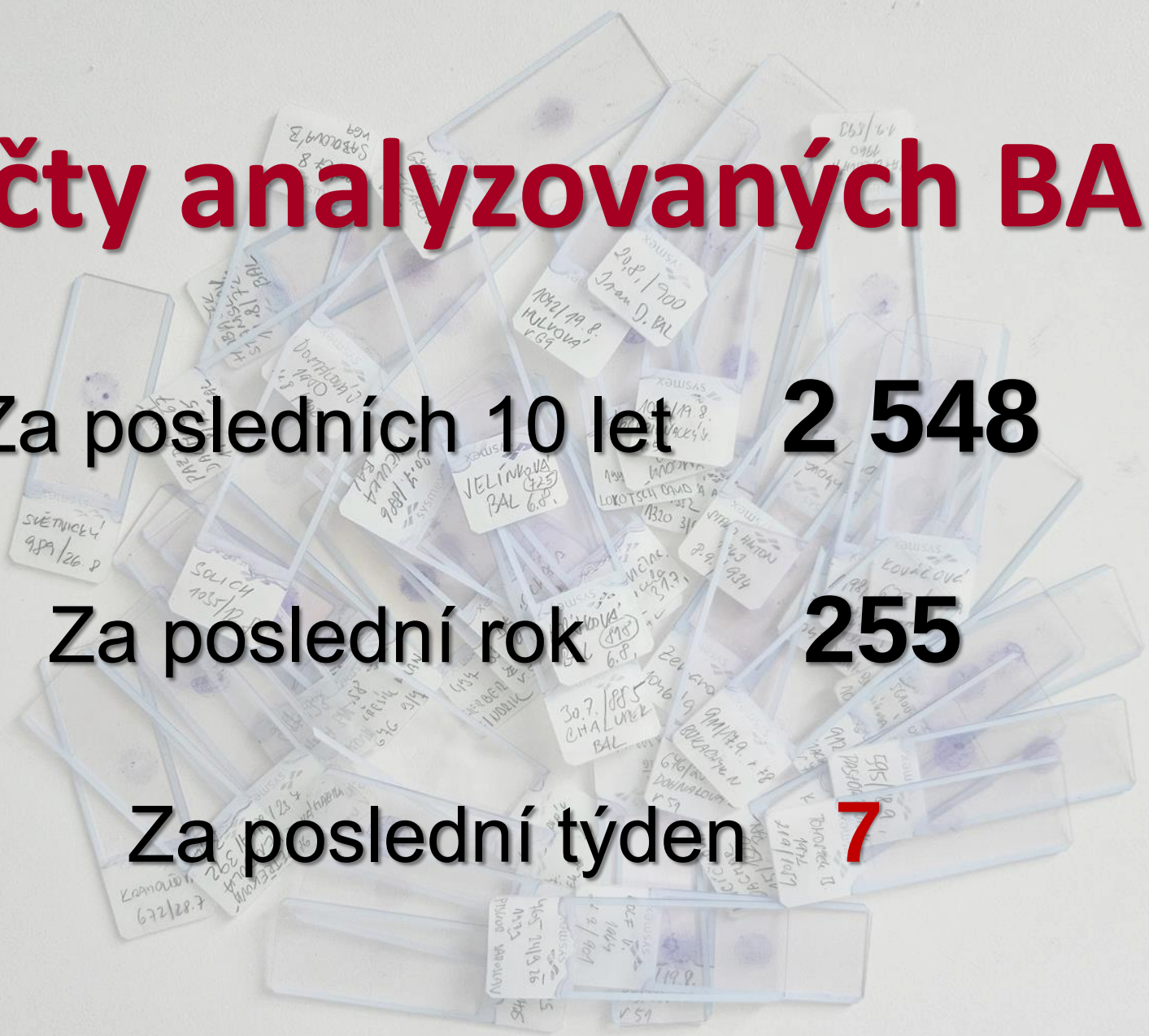
3. Zpětná aspirace bronchoalveolární tekutiny (BAT/BAL/BALT), úspěšná laváž – návratnost 40 – 70 % původně aplikovaného objemu.

Krok za krokem: Postup výkonu

4. Laboratorní zpracování vzorku

- **Cytologie:** diferenciál buněk BAL mikroskopicky (podíl makrofágů, lymfocytů, neutrofilů, eosinofilů), identifikace nádorových buněk
- **Mikrobiologie:** kultivace, průkaz běžných bakterií, plísní a kvasinek a testování citlivosti na antibiotika.
- **Molekulární biologie:** PCR testy na přítomnost virů či specifických infekcí (např. *Pneumocystis jirovecii*).
- **Průtoková cytometrie**

Počty analyzovaných BAL



Za posledních 10 let **2 548**

Za poslední rok **255**

Za poslední týden **7**

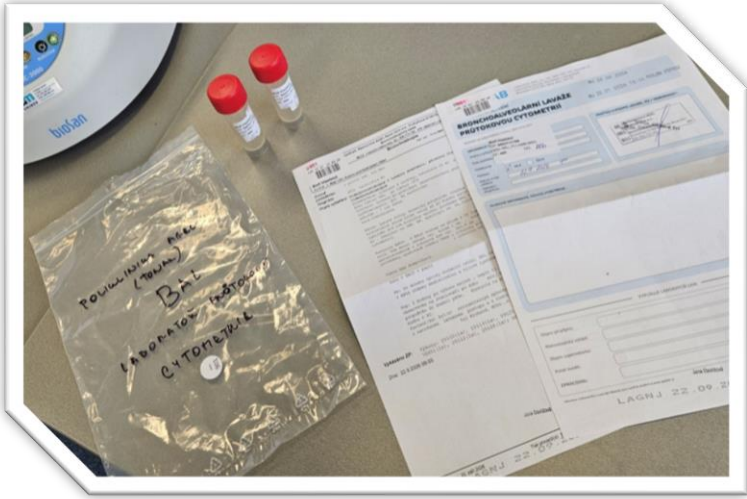
Týden s BAL v naší laboratoři

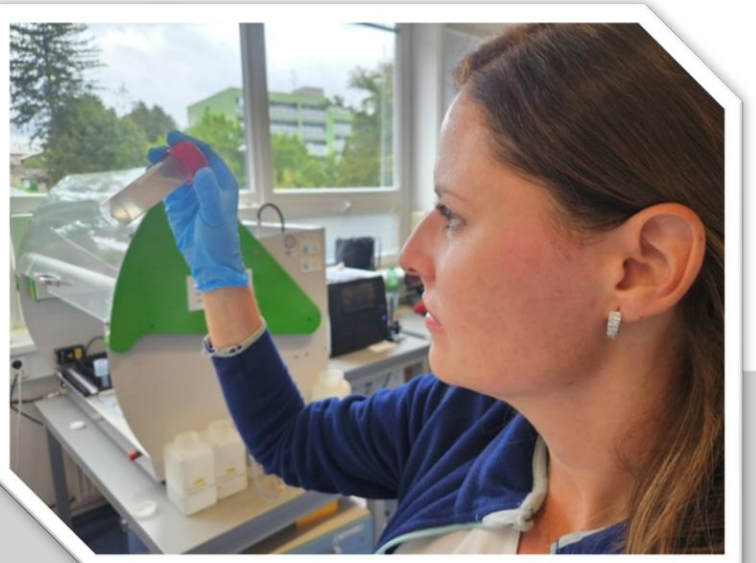
Postup přípravy vzorku

1. změření **objemu,** posouzení **makroskopického vzhledu BAL**

→ barva - **červená** - příměs krve u výkonu anebo krvácení v dýchacích cestách, **načernalá, šedá** - kuřák, horník, Ostravak …

→ přítomnost hlenu, jiných částic





2. oddělení části materiálu pro přípravu **mikroskopického nátěru**



Týden s BAL v naší laboratoři

Příprava vzorku pro cytometrii

1. Filtrace přes sterilní gázu - odstranění shluků hlenu a rozpadlé buněčné hmoty, které by mohly ucpat trysku cytometru.

2. Zakoncentrování – 2 x centrifugace při 2300 ot/10 min/4°C, resuspendace v 1 ml fyziologickém roztoku

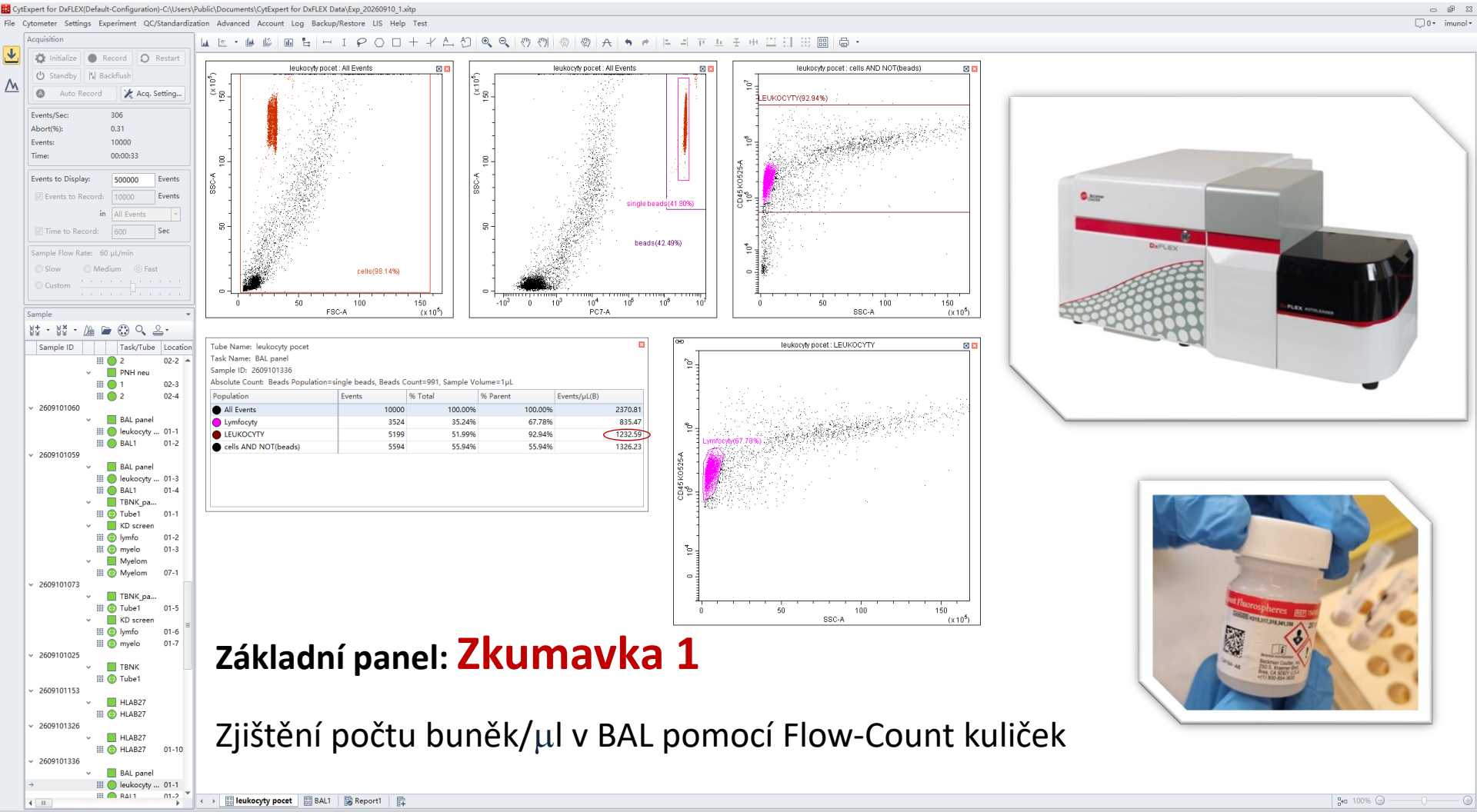
5. Značení fluorochromy, inkubace, promytí

3. Lýza erytrocytů lyzačním činidlem VersaLyse s přídavkem fixačního činidla



Týden s BAL v naší laboratoři

Fenotypizace buněk BAL – cytometr DxFLEX

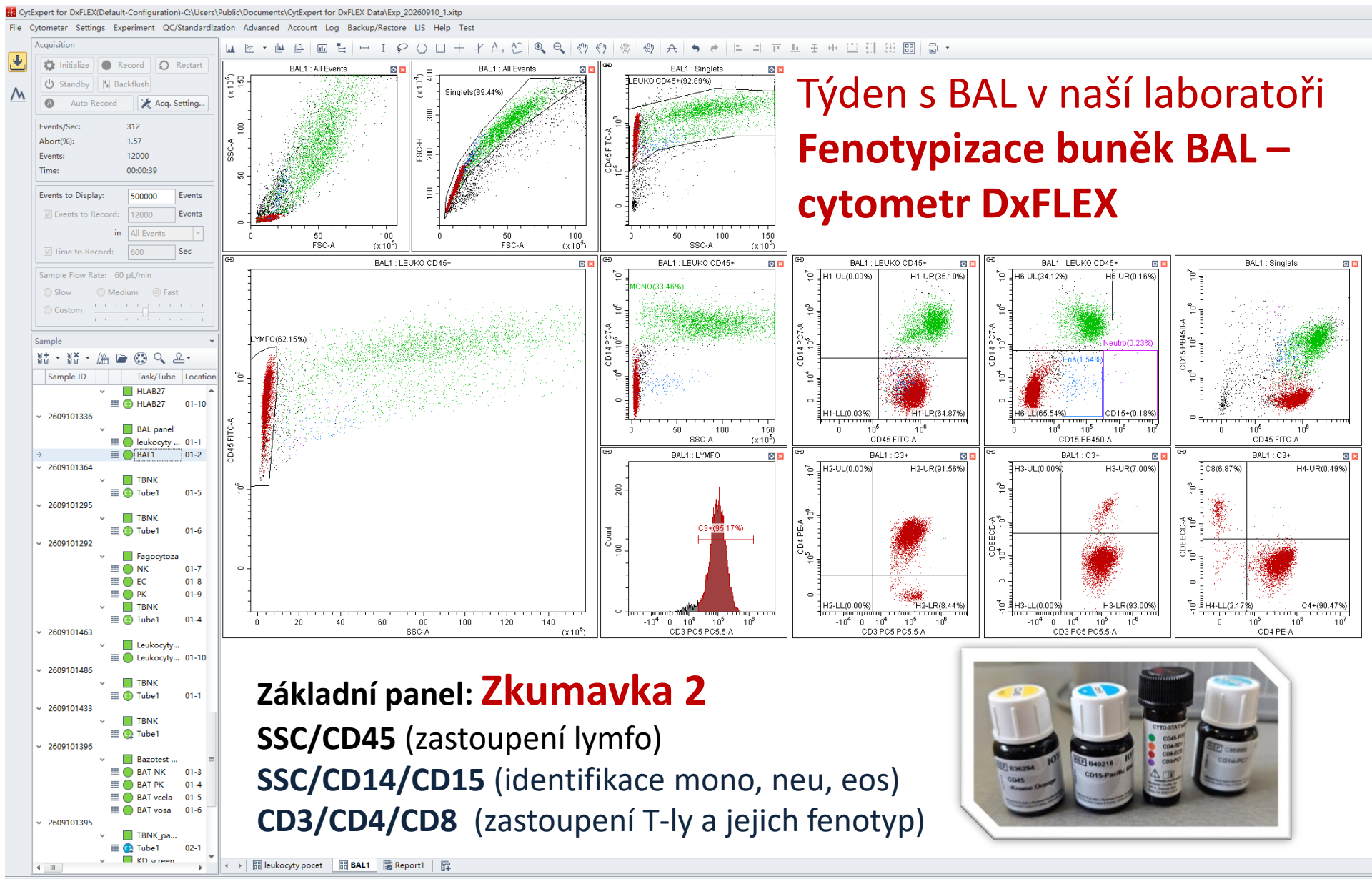


Základní panel: Zkumavka 1

Zjištění počtu buněk/µl v BAL pomocí Flow-Count kuliček

Týden s BAL v naší laboratoři

Fenotypizace buněk BAL – cytometr DxFLEX



Základní panel: Zkumavka 2

SSC/CD45 (zastoupení lymfo)

SSC/CD14/CD15 (identifikace mono, neu, eos)

CD3/CD4/CD8 (zastoupení T-ly a jejich fenotyp)

AGEL LABORATOŘE

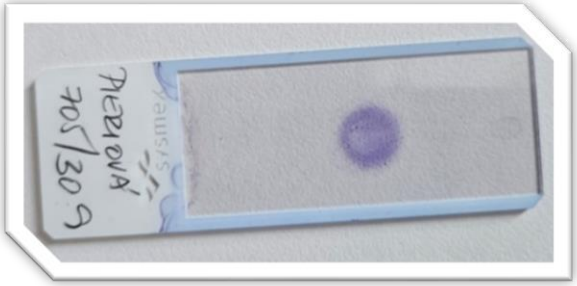
Týden s BAL v naší laboratoři

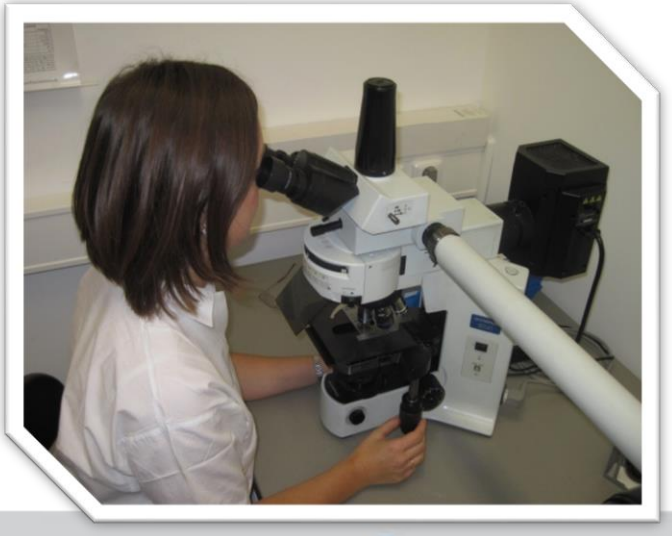
Mikroskopie



- **příprava preparátu** v sedimentační komůrce (ředění fyziologickým roztokem na základně informace o počtu buněk získané z cytometru)

- **barvení** preparátu dle Giemsa





- **analýza** buněk **mikroskopicky**

BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽ

normální hodnoty buněčného profilu

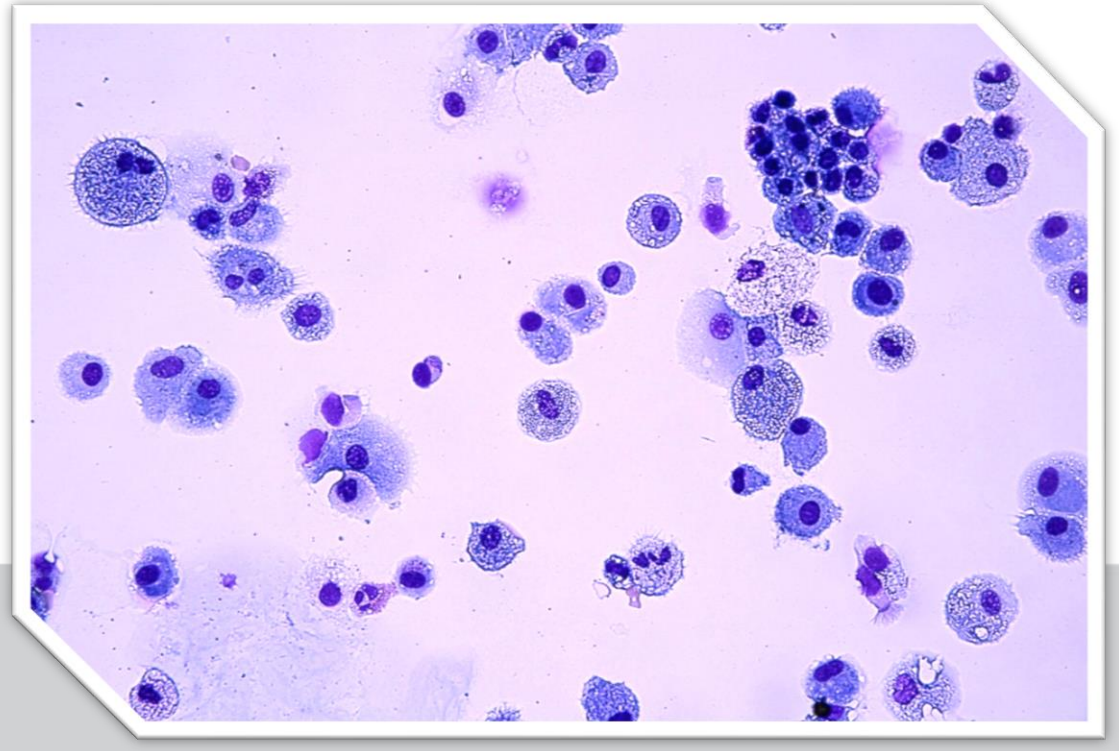
- **počet leukocytů**: 70 – 150 buněk/μl (krev: 4-10 tis. buněk/μl)

  variabilní parametr, závislý na dráždivosti pacienta, metodice provedení bronchoskopie a výplachu, zručnosti bronchologa, u kuřáků je počet vyšší

- **makrofágy**: > 85 %
- **lymfocyty**: do 15 %

  z toho 70-90 % T-ly

  IRI 1-2,5
- **neutrofily**: do 4 %
- **eozinofily**: do 1 %



BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽ - cytologické výstupy

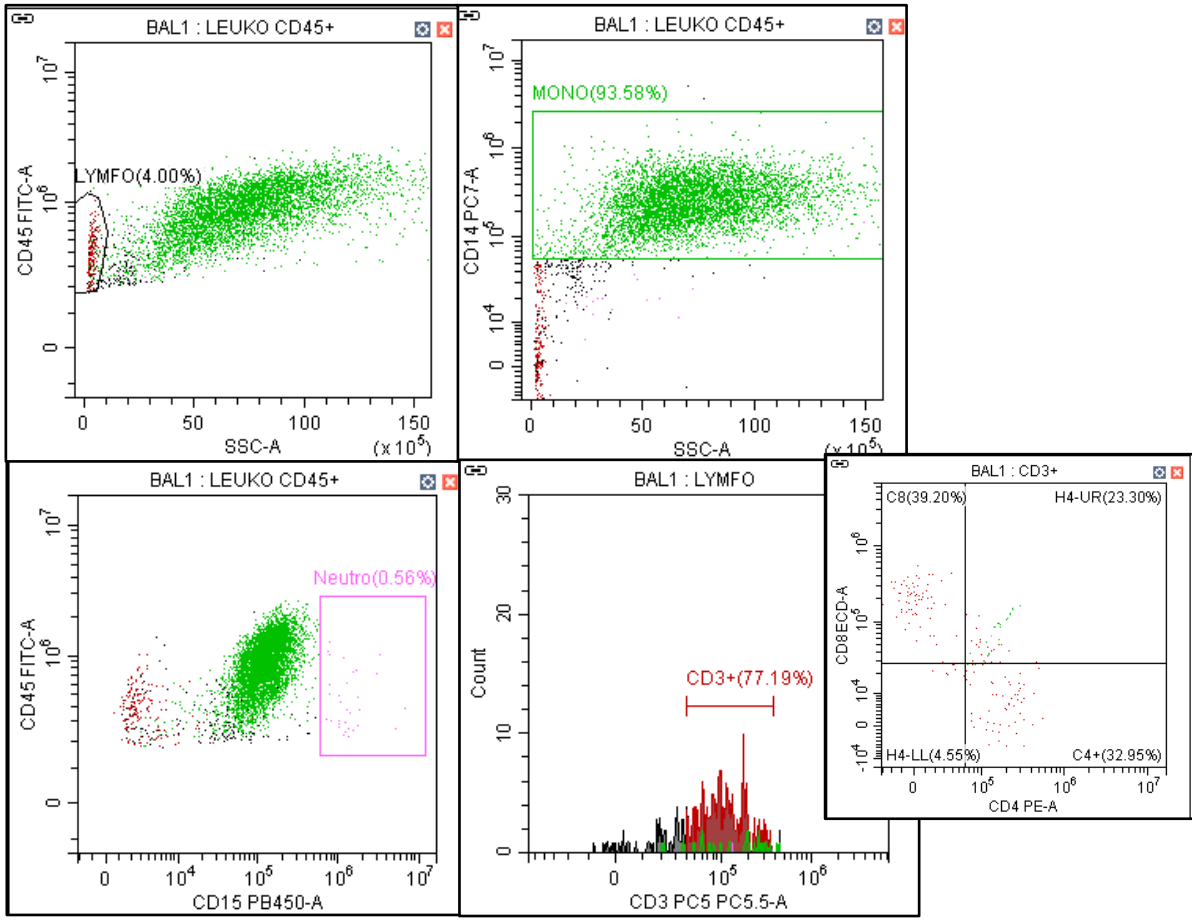
Cytologie	Dif. diagnóza
Zmnožení lymfocytů (tzv. lymfocytární alveolitida). *Ve více než 90 % se jedná o T-lymfocyty.*	**Sarkoidóza** (s převahou CD4+ T-lymfocytů), jiná intersticiální plicní onemocnění, alveolitidy po prodělané viróze, tuberkulóza, lymfoproliferativní onemocnění (s převahou B-lymfocytů)
Zmnožení **neutrofilů** (pozor na možnou **příměs periferní krve** při odběru!)	**Bakteriální pneumonie**, intersticiální fibrotizující plicní procesy v pokročilém stadiu (smíšené alveolitidy: lymfocyty + neutrofily)
Zmnožení **eozinofilů**	Eozinofilní pneumonie, parazitární pneumonie, aspergilóza, asthma bronchiale
Maligní **nádorové buňky**	Bronchogenní karcinom, metastázy solidních tumorů
Inkluze v alveolárních makrofázích	**Siderofágy** při plicních hemoragiích (krvácení), lymfofágy, **anorganické částice -** prašná expozice - hnědé respektive šedé inkluze u kuřáků, svářečů a horníků
Přítomnost **epitelií**	**Dlaždicový epitel -** kontaminace ze sliznice dutiny ústní a hltanu **Cylindrický epitel -** záchyt buněk z dolních dýchacích cest

BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽ - cytometrické výstupy

Flow cytometrie		Dif. diagnóza
Zvýšený poměr CD4+/CD8+ lymfocytů (> 3,5) a zmnožení celkových T-lymfocytů	⇨	**Sarkoidóza**, tuberkulóza, berylióza
Výrazně **snížený poměr CD4+/CD8+** lymfocytů (často < 0,5) a zmnožení aktivovaných CD8+ T-lymfocytů	⇨	Exogenní alergická alveolitida, polékové poškození plic (amiodaron, antikoagulancia - **až 5 % IPP!**), virové pneumonie
Nález **> 5 % Langerhansových buněk (CD1a+/CD207+)**	⇨	Histiocytóza z Langerhansových buněk
Zmnožení granulocytů nebo masivní přítomnost erytrocytů (**POZOR na příměs PK!)**	⇨	**Bakteriální infekce**, difuzní alveolární hemoragie, eozinofilní pneumonie, idiopatická plicní fibróza, pneumocystóza, aspergilóza
Extrémní **autofluorescence** a **vysoký SSC** makrofágů	⇨	Plicní alveolární proteinóza, kuřáci, horníci
Klonální/aberantní buněčná populace	⇨	Maligní onemocnění (lymfomy, leukémie, metastázy solidních nádorů)

Fenotypizace BAL: normální nález

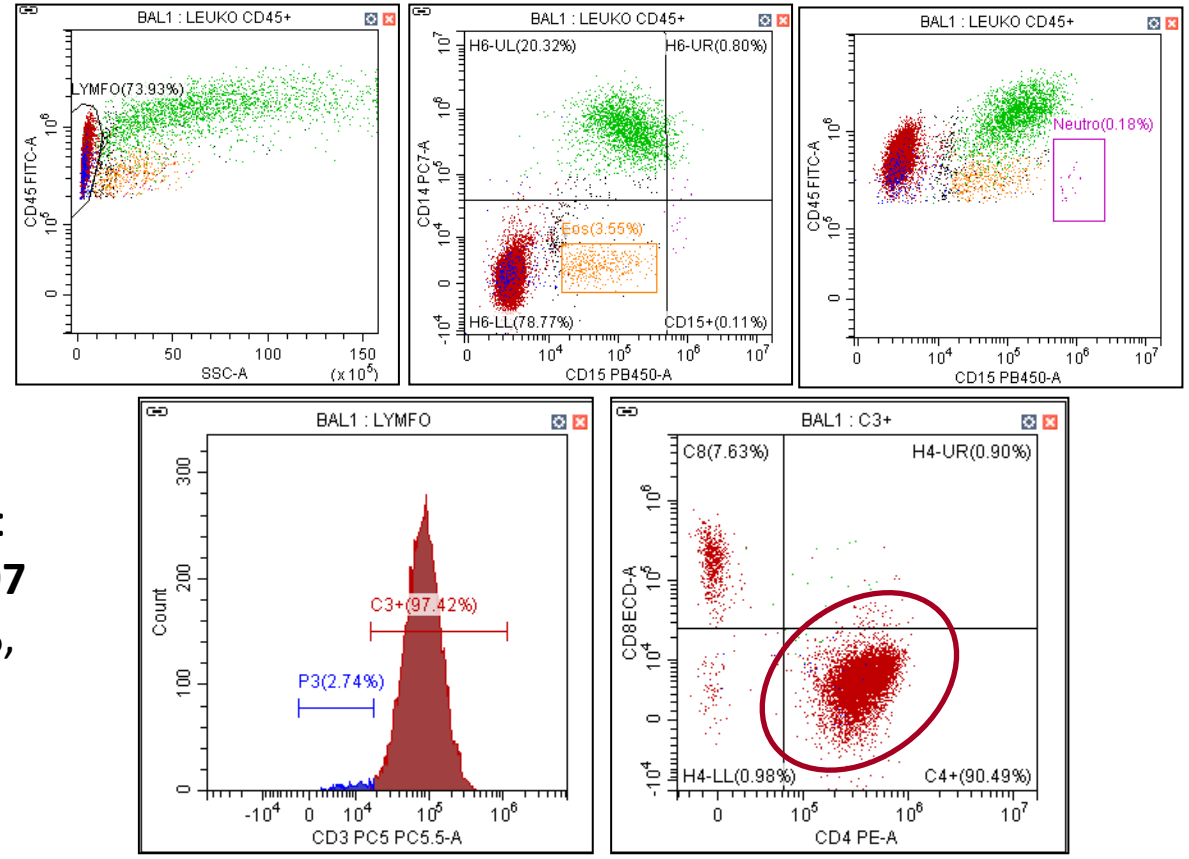
- Žena, 71 let
- Dif. dg.: pleuropneumonický sy.
- Makroskopický vzhled: bezbarvá, lehká příměs hlenu
- Objem při příjmu: 15 ml
- Počet buněk: 13 bb/ul (norma: 60-150)
- Diferenciální rozpočet leukocytů: MF 94 %, lymfo 4 %, neutro 0,5 %
- Fenotyp T-lymfocytů: poměr CD4/CD8 = 1
- Mikroskopie: málo buněčná BAL s příměsí hlenu a epitelií, dominují alveolární makrofágy

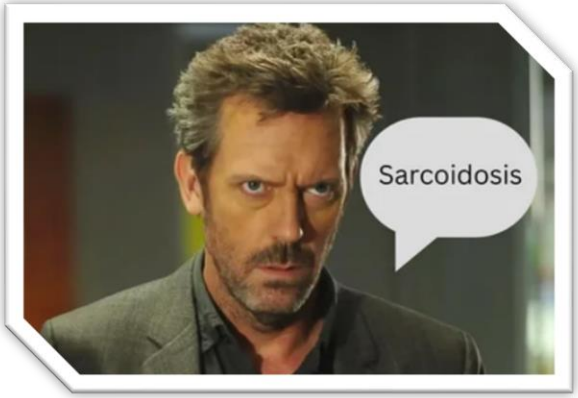


Závěr: V BAL bez nálezu alveolitidy.

FenotypizaceBAL: susp. sarkoidóza

- Žena, 71 let
- Dif. dg. sarkoidóza
- Makroskopický vzhled: mírně zakalená, bez hlenu
- Objem při příjmu: 32 ml
- Počet buněk: 336 bb/ul (norma: 60-150)
- Diferenciální rozpočet leukocytů: MF 21 % ↓, **lymfo 74 % (z toho 97 % T-lymfocyty)** ↑↑, neutro 0,2 %, eos 3,5 % ↑
- Fenotyp T-lymfocytů: **CD4+**↑↑, poměr **CD4/CD8 = 12** ↑↑
- **Mikroskopie:** hypercelulární BAL s příměsí hlenu a epitelií, dominují **lymfocyty**

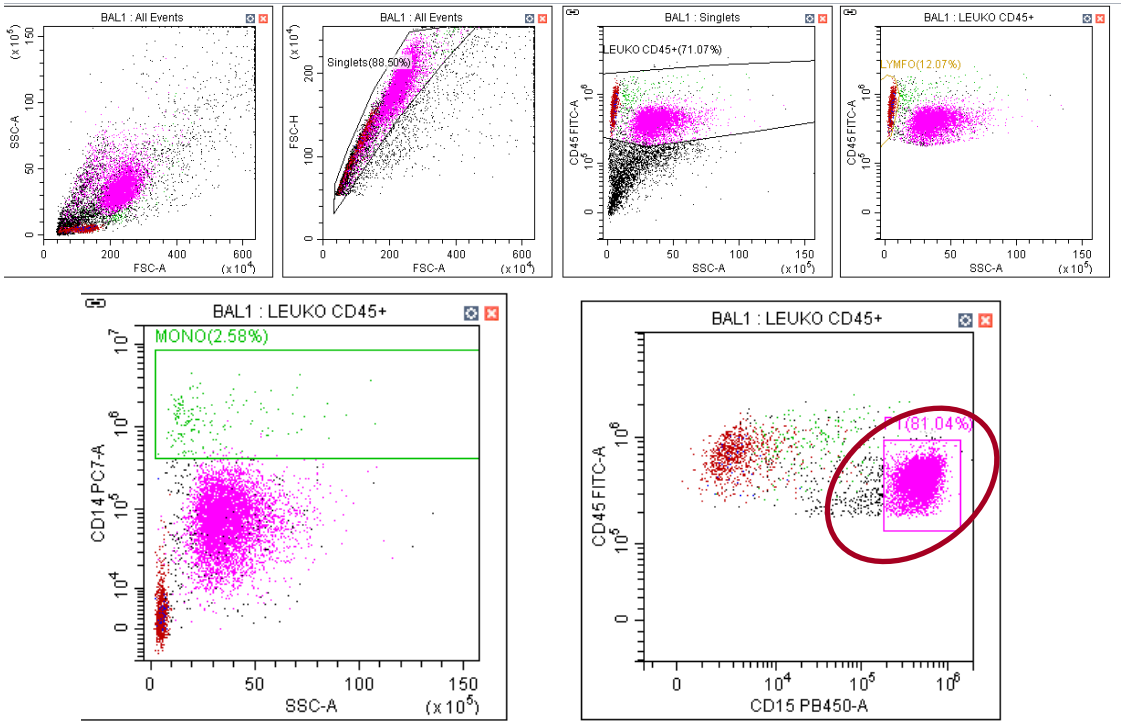




Závěr: masivní T-lymfocytární alveolitida s výrazně zvýšeným poměrem IRI a mírným zmnožením eosinofilů. Nález podporuje susp. dg. sarkoidózy plic.

Fenotypizace BAL: susp. bakteriální pneumonie

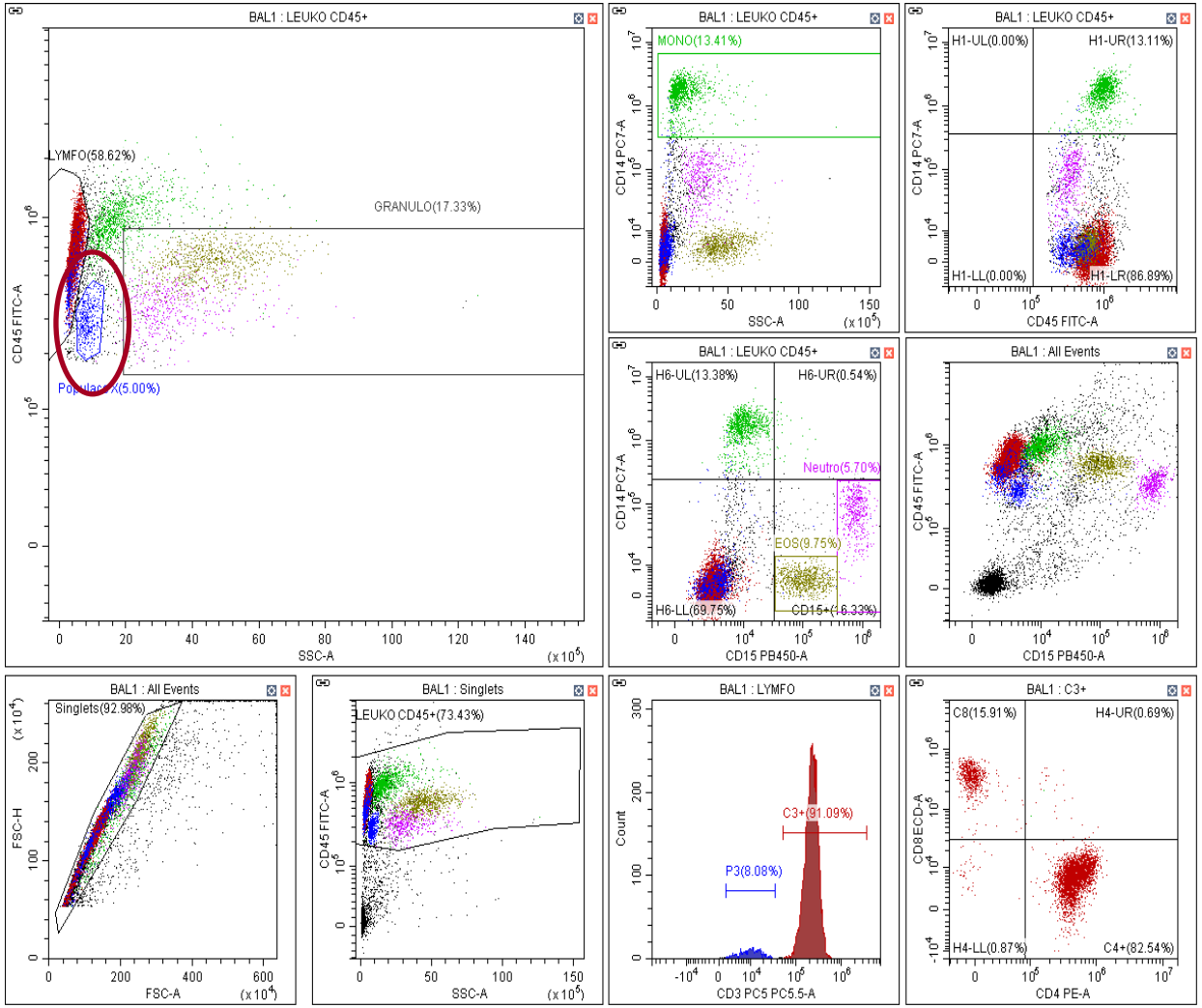
- Muž, 70 let
- Dif. dg. bronchopneumonie susp. bakteriální (**CRP 200 mg/l**)
- Makroskopický vzhled: **čirá** s lehkou příměsí hlenu
- Objem při příjmu: 15 ml
- Počet buněk: 131 bb/ul (norma: 60-150)
- Diferenciální rozpočet leukocytů: MF 3 % ↓↓, lymfo 12 %, **neutro 81 %** ↑↑
- Mikroskopie: BAL s příměsí hlenu a epitelií, dominují neutrofily



Závěr: V BAL bez nálezu lymfocytární alveolitidy, výrazné zmnožení neutrofilů. Nález susp. svědčí pro bakteriální zánět.

Fenotypizace BAL: příměs PK?

- Muž, 85 let
- Dif. dg. pneumonie
- Makroskopický vzhled: **bezbarvá**, lehká příměs hlenu
- Objem při příjmu: 8 ml
- Počet buněk: 86 bb/ul (norma: 60-150)
- Diferenciální rozpočet leukocytů: **mono 13 % ↓, lymfo 59 % ↑↑, neutro 6 % , Eos 10 % ↑↑, populace X 5% - zóna bazofilů**
- Fenotyp T-lymfocytů: poměr **CD4/CD8 = 5,5 ↑**

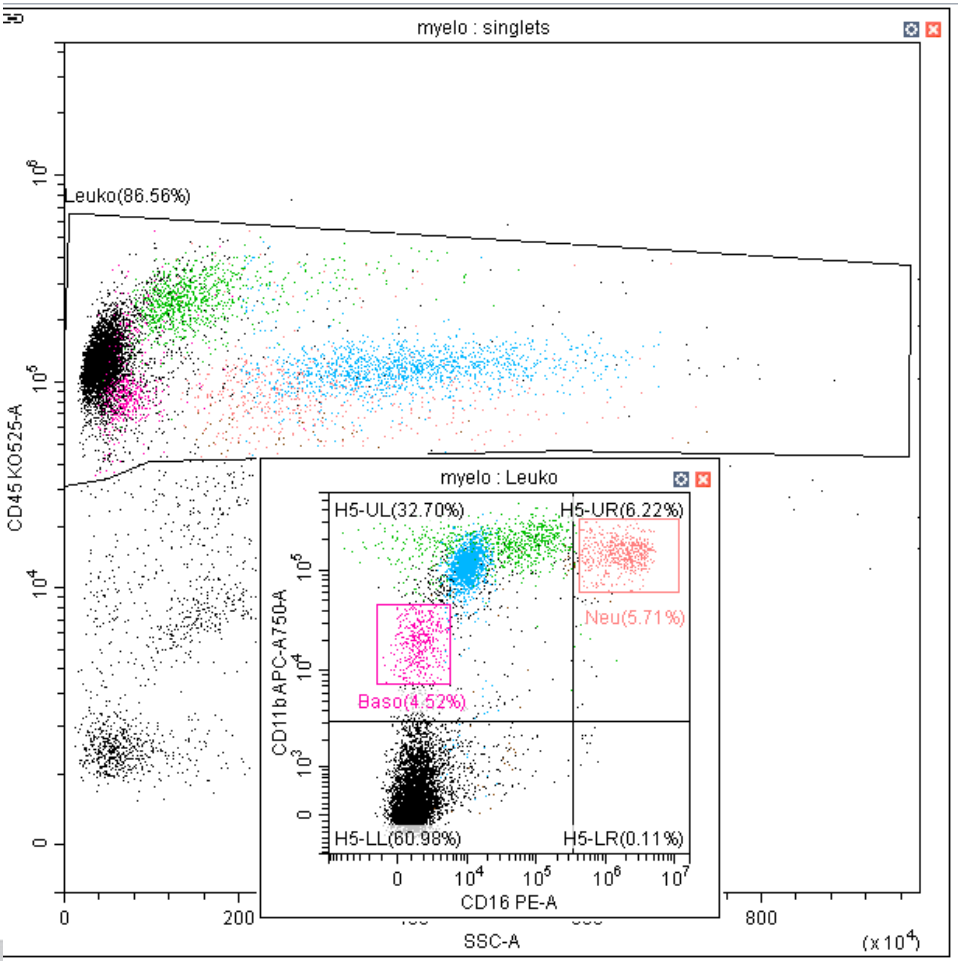


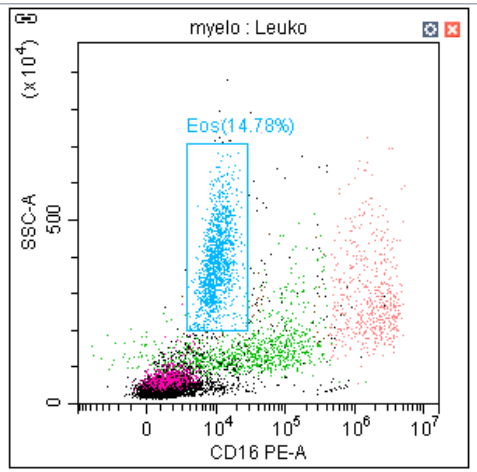
Fenotypizace BAL: PK screen

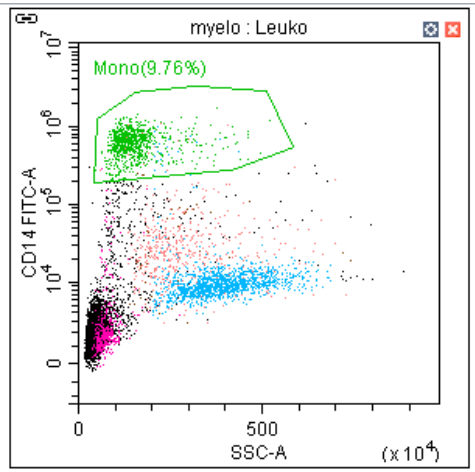
Zkumavka 1

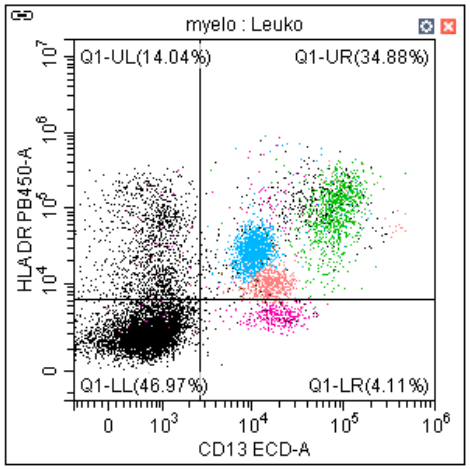
Populace X:

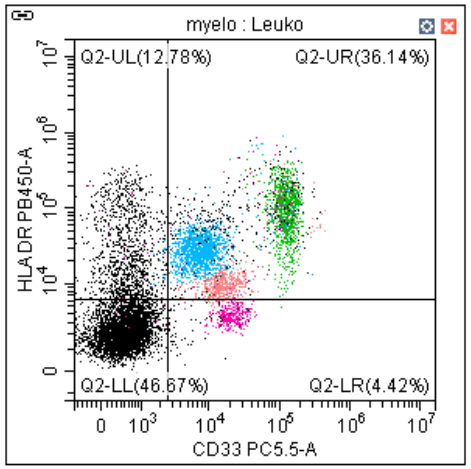
CD13+, CD33+, CD11b dim, HLA-DR- = **bazofily**







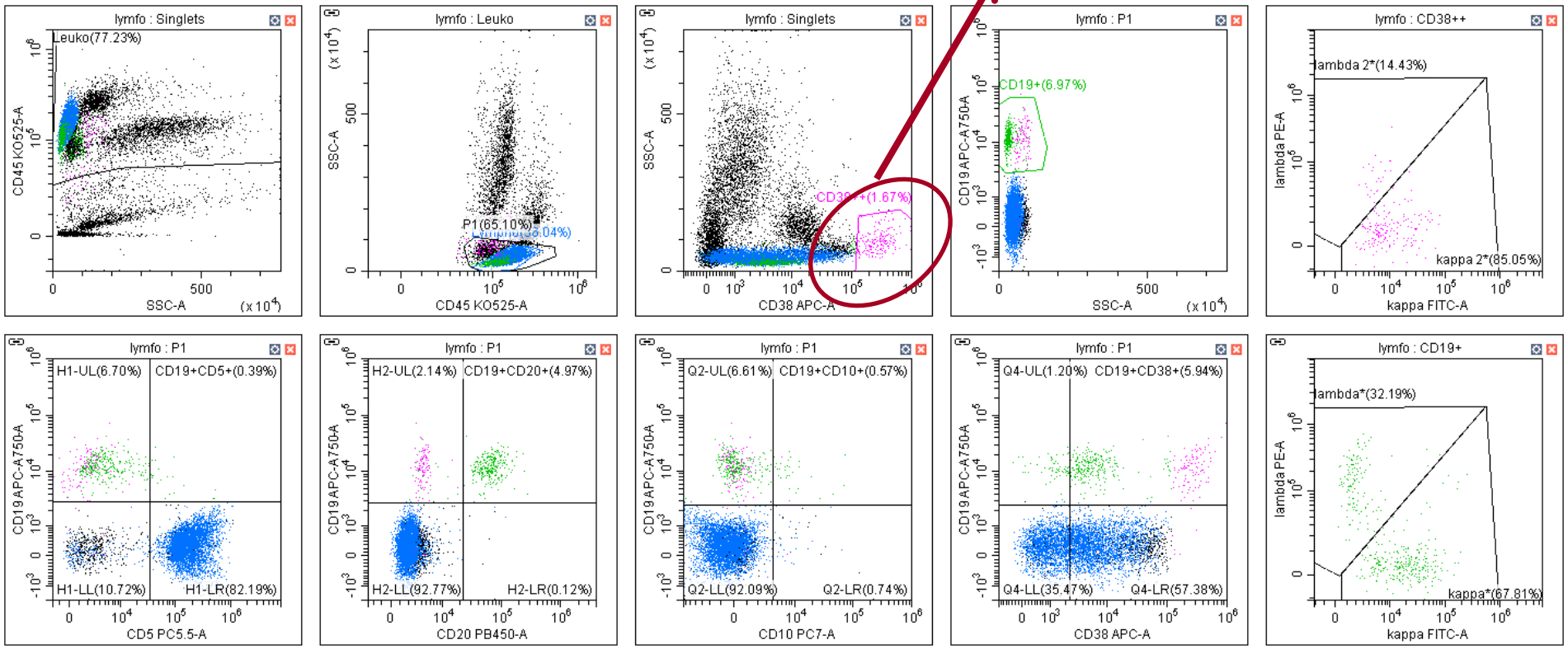


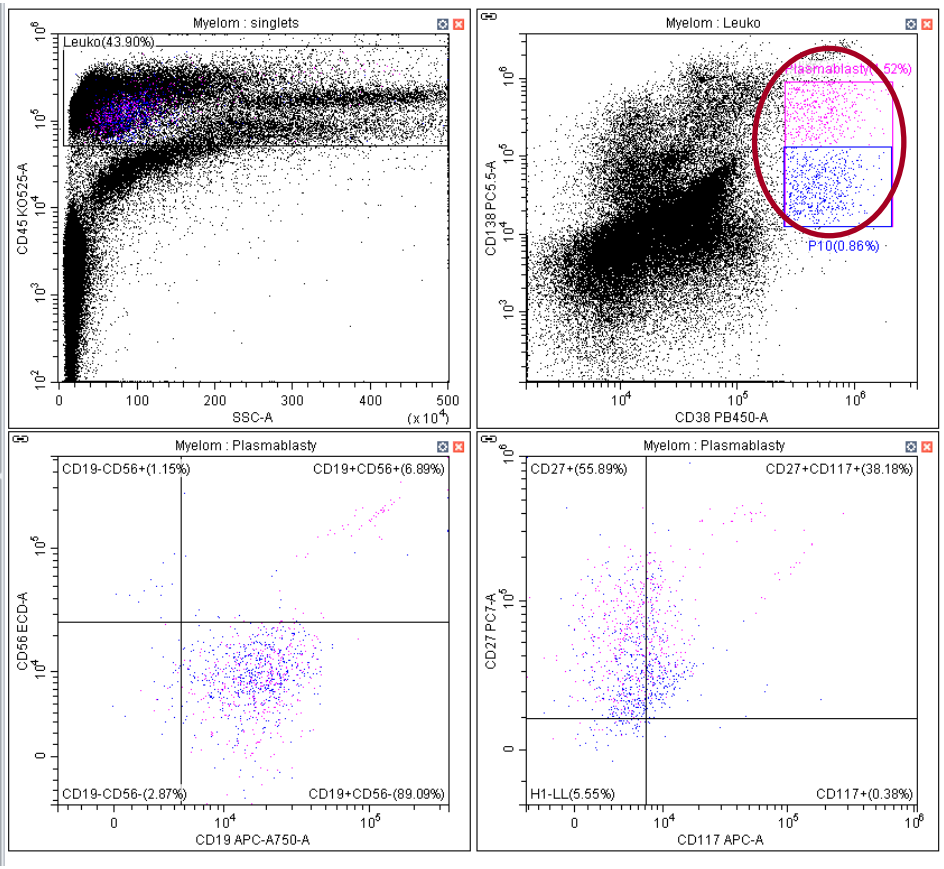


Fenotypizace BAL: PK screen
Zkumavka 2

Nález populace: CD19+, CD38++, CD20-, CD5-, CD10-, ↓SSC, sIg+, převaha lehkých řetězců kappa

Plazmablasty?
Plazmocyty..?

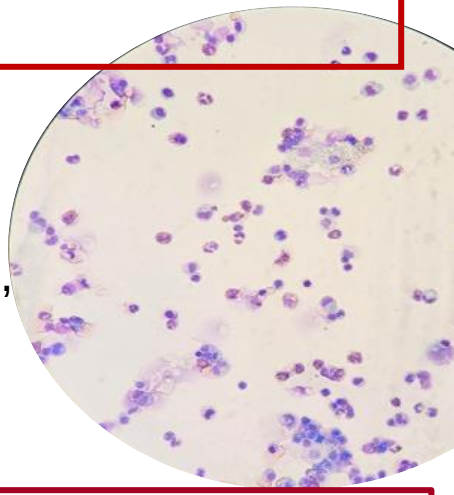




Populace **CD19+, CD38/CD138+, CD56-, CD27+, CD117-/+**

Nález v KD z roku 2021:

V KD nacházíme 3,2 % plasmatických buněk, většina (cca 96%) je klonálního fenotypu CD19dim, CD56-, CD27+, CD117-, cyt. kappa+.



Mikroskopie: ojediněle MF, erytrocyty, a epitelie, zmnožení populací neu, eos a lymfo.

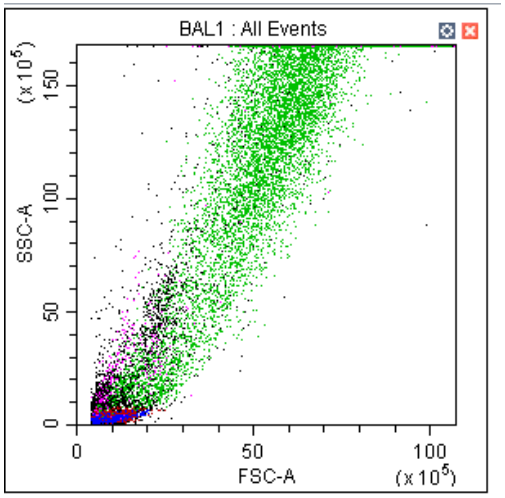
Závěr: Ve směsném vzorku BAL a PK převažují T lymfocyty se zvýšeným poměrem IRI. Jsou přítomny populace eosinofilů (10%), neutrofilů (6%) a basofilů (5%). Vzhledem k nálezu minoritní populace plazmatických buněk s klonálním charakterem doporučeno vyšetření hematologem.

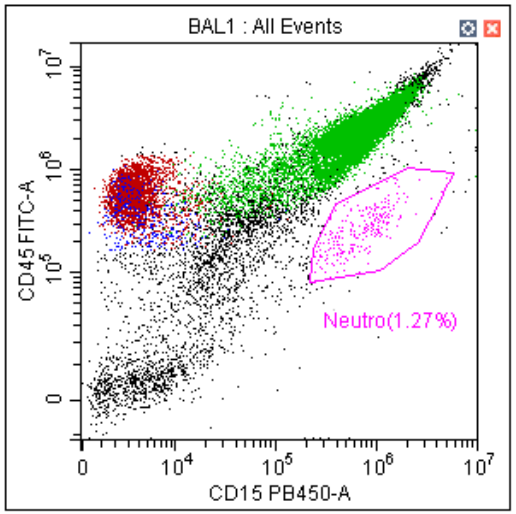
Fenotypizace BAL: kuřák, horník

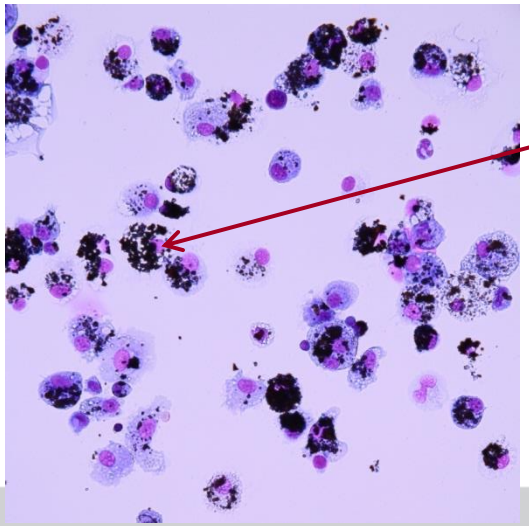
- Muž, 62 let, exkuřák, 7 let fáral
- Makroskopický vzhled: **nažloutlá** s lehkou příměsí hlenu

- Diferenciální rozpočet leukocytů: **MONO/MF 79 % (výrazná autofluorescence, SSC↑↑)**, lymfo 19 %, neutro 1 %

- Mikroskopie: dominují **výrazně vakuolizované a pěnové alveolární makrofágy** s fagocytovaným materiálem susp. anorganického původu







inkluze v makrofázích

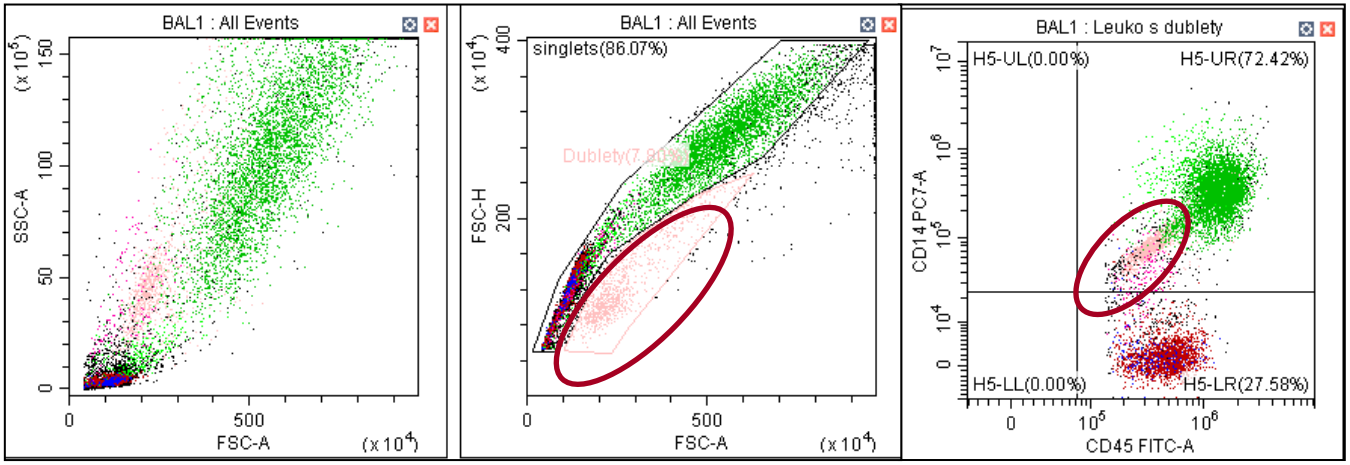
Závěr: Morfologický obraz MF odpovídá prašné expozici pacienta.

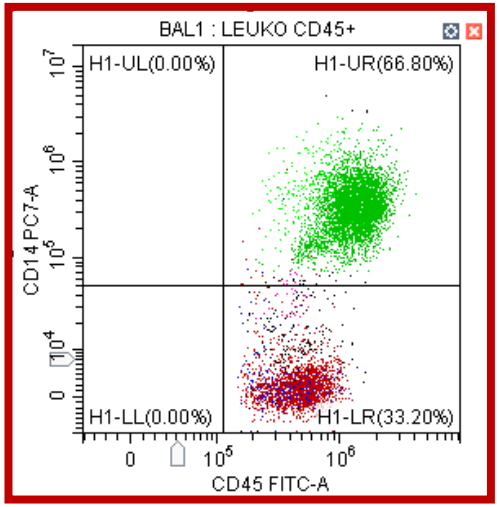
AGEL LABORATOŘE

Fenotypizace BAL: singlety

BALT je díky svým specifickým biologickým a fyzikálním vlastnostem náchylná k tvorbě dubletů a jiných shluků.

- **Plicní hlen a surfaktant** fungují jako mechanické „lepidlo“.
- Dominantní populací jsou **makrofágy** s vysokou adhezivitou.
- **Extracelulární DNA** z rozpadlých buněk zachycuje okolní buňky do sítí.
- **Zánětlivé prostředí** – zvýšená exprese adhezivních molekul a specifických receptorů na imunocytech.
- **Přítomnost epitelií,** které na sebe vážou další buňky.





Závěrem..

Odběr BAL

Miniinvazivní přístup k reprezentativnímu lokálnímu vzorku

+

Cytometrie

Objektivní imunofenotypizace a vysoká citlivost

+

Cytologie

Morfologická kontrola

Komplexní analýza BAL spojením **mikroskopie a průtokové cytometrie** poskytuje rychlý a přesný obraz o imunologickém dění přímo v plicní tkáni, což zásadně **usnadňuje cestu ke správné diagnóze.**

- Wersto et al., *Cytometry* (Doublet discrimination & DNA nets)
- Burel et al., *Front. Immunol.* / CellCarta 2024 (T cell-APC/Macrophage complexes)
- Innes et al., *J. Immunol. Methods* / PMC3677049 (Mucus & airway cell aggregation)
- Stong et al., *Chest* 2024 (BALF flow cytometry and gating strategies)

AGEL LABORATOŘE