

CAT
Critically Appraised Topic**Diagnostisch nut van een cytologisch bronchoalveolair lavage (BAL) onderzoek bij niet-infectieuze longaandoeningen**

Author: Eveline Vancraeynest
Supervisor: dokter A. Luyckx
Search/methodology verified by: dokter A. Luyckx
Met dank aan professor dr. T. Van Maerken
Date: 08/06/2021

CLINICAL BOTTOM LINE

Een broncho-alveolaire lavage (BAL) vocht heeft een toegevoegde waarde in de diagnostiek van niet-infectieuze longaandoeningen mits het een representatief staal betreft. Dit vereist een correcte en liefst gestandaardiseerde afname alsook analytische verwerking. De nodige expertise is vereist voor adequate beoordeling van het BAL vocht waarbij kennis van de normale cellulaire samenstelling essentieel is. Verder is het belangrijk om geïnformeerd te zijn over allerlei factoren zoals leeftijd, rookgewoonte en medicatiegebruik gezien deze een invloed hebben op de cellulaire samenstelling van het BAL vocht. Analyse van een BAL vocht is een goede methode om verschillende niet-infectieuze longaandoeningen te onderscheiden, enerzijds door het aantonen van karakteristieke cellulaire eigenschappen en/of anderzijds op basis van de sterk verschillende verhouding van de celtypes in het BAL vocht. In een aantal gevallen zou een BAL vocht onderzoek meer invasieve diagnostieken kunnen voorkomen maar veelal mag het niet als geïsoleerd diagnostisch onderzoek worden beschouwd en moet het worden meegenomen in de bredere diagnostisch context van kliniek, laboratoriumgegevens, radiologie en eventueel histologie. Binnen onze verzameling BAL vochten uit de praktijk konden we de meerwaarde van een BAL vocht onderzoek in de diagnostiek van diffuus interstitiële longziekte (ILD) aantonen (alle formules waren concordant met de diagnose). Op basis van de bevindingen na grondig literatuur onderzoek en na eigen analyse van BAL vochten uit de praktijk, willen we als actieplan de laboratoriumdiagnostiek en rapportering van het BAL vocht onderzoek finetunen ten gunste van de klinische interpretatie, en dit na overleg met de pneumologen.

Binnen de specifieke context van sarcoïdose werd de waarde van flowcytometrie geëvalueerd. Na literatuuronderzoek konden we besluiten dat cytologisch onderzoek en flowcytometrie op zichzelf onvoldoende zijn om de diagnose van sarcoïdose te kunnen stellen, maar dat deze onderzoeken coherent zijn aan andere diagnostische bevindingen. Indien er klinische en radiologische argumenten zijn voor sarcoïdose dan kunnen de bevindingen van een lymfocytose ($>10\text{-}25\%$) in combinatie met een gestegen $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ verhouding ($\geq 3\text{-}3.5$) en gedaalde $\text{CD103}^+/\text{CD4}^+$ ratio (<0.2) een aanvulling zijn op de diagnose. De $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ ratio kan echter beïnvloed worden door verschillende factoren die mee in rekening moeten worden gebracht bij de interpretatie. Onze patiëntengroep was te klein om een besluit te kunnen vormen omtrent de bruikbaarheid van flowcytometrie in de diagnose van sarcoïdose.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Als eerste doelstelling willen we met deze CAT de diagnostische waarde van een BAL vocht onderzoek bij niet-infectieuze longaandoeningen in kaart brengen. Dit zullen we enerzijds doen op basis van literatuuronderzoek en anderzijds aan de hand van voorbeelden verzameld tijdens mijn stage. Gezien de goede samenwerking binnen het E17 netwerk tussen het laboratorium van AZ Maria Middelaars (AZMM) Gent, AZ Sint-Vincentius Deinze (AZSVD) en AZ Groeninge (AZG) Kortrijk, kreeg ik de opportuniteit om een ruim aanbod aan BAL vochten te verwerven. Indien een toegevoegde diagnostische waarde kan worden aangetoond van BAL vocht onderzoek met deze CAT, dan willen we onze bevindingen verder integreren en/of afstemmen in de huidige BAL vocht rapportering naar de clinicus.

Het doel van een BAL is het collecteren van cellulair en acellulair materiaal van de lagere luchtwegen. Het biedt enkele voordelen ten opzichte van een biopsie: 1) BAL is een veilige, niet-invasieve techniek met een lage morbiditeit en mortaliteit.^{1,2} 2) Een groter gebied van de longen kan worden bereikt dan via een biopsie en door onderzoek van het spoelvocht kan meer inzicht worden verkregen in de morfologische, microbiologische, immunologische en chemische aspecten van processen in de kleine luchtwegen en de alveolaire ruimten.^{3,4} Indien een BAL correct wordt uitgevoerd, analytisch verwerkt en geïnterpreteerd, dan kan het een toegevoegde waarde hebben in de diagnostiek van zowel infectieuze als niet-infectieuze longaandoeningen. Het aantonen van

karacteristieke cellen en/of eigenschappen in een BAL vocht kan helpen bij het bevestigen van een vermoedelijke diagnose of bij aanwezigheid van specifieke celprofielen kan door combinatie van kliniek, laboratoriumuitslagen, beeldvorming, longfunctiemetingen en/of biopsie meestal een definitieve diagnose worden gesteld.^{4,5}

Er is op heden nog geen wereldwijde standaardisatie voor het uitvoeren van een BAL en verwerken van een BAL vocht, wel zijn verschillende nationale en internationale richtlijnen en aanbevelingen beschikbaar. Verschillen in de verwerking van BAL vochten met als gevolg soms suboptimale kwaliteit, is één van de hoofdoorzaken waarom een BAL onderzoek nog niet universeel is aanvaard in de diagnostiek van infectieuze en niet-infectieuze longaandoeningen.^{4,6-12}

BAL procedure

Voor de uitvoering van een BAL wordt gebruik gemaakt van een glasvezel bronchoscoop. Premedicatie bestaat meestal uit een sedatiemiddel (bv. diazepam) en medicatie voor dilatatie van de bronchi (bv. atropine). Een beperkte hoeveelheid lokale anesthetica wordt gebruikt (bv. lidocaïne). De locatie van de lavage hangt af van de plaats van de abnormaliteit(en) op beeldvorming. Indien er diffuus longlijden is, dan gebeurt de lavage meestal ter hoogte van de rechter midden lob of lingula gezien dit de meest toegankelijke locatie is. Een lavage ter hoogte van 1 longcompartiment is representatief voor de hele long bij diffuus interstieel longlijden.¹² Er zijn echter centra die een lavage verrichten op 2-3 verschillende longcompartimenten. Het is voornamelijk van belang altijd de locatie en het aantal locaties te specificeren in het klinisch BAL verslag.¹¹ De vloeistof die wordt gebruikt voor de lavage is steriel 0.9 % NaCl op kamertemperatuur of verwarmd op 37°C. Meestal wordt 100-150 ml gebruikt met een maximum van 300 ml, verdeeld over verschillende delen (bv. 5 x 20 ml of 3 x 50 ml). De Nederlandse Vereniging voor cytometrie (NVC) adviseert om minimaal 100 ml te gebruiken (vaak 2-4 x 50 ml).⁸ Het totale volume dat men terug verkrijgt, moet $\geq 30\%$ zijn van het totaal gebruikte volume.⁷ De eerst verkregen portie bevat meestal een disproportionele hoeveelheid bronchusmateriaal in tegenstelling tot de volgende verkregen porties die de alveolaire fractie vertegenwoordigen. Er is geen consensus over het feit of de verschillende verkregen porties gepoold mogen worden of dat het eerste deel apart moet worden gehouden.^{1,7,13} Het is vooral van belang dat de gebruikte werkwijze wordt vermeld in het klinisch BAL verslag door de uitvoerende arts.^{7,11,13,14}

BAL vocht verwerking

Voor cytologisch onderzoek is er minimum 5 ml staal nodig met een optimaal volume van 10-20 ml. Het BAL vocht moet zo snel mogelijk naar het laboratorium worden getransporteerd, met voorkeur binnen het uur na afname.⁷

- **Witte bloedceltelling**

In het laboratorium van AZMM en AZSVD wordt de witte bloedcel (WBC) telling op het BAL vocht niet gerapporteerd aan de aanvragende arts gezien het potentieel dilutie-effect veroorzaakt door de variabiliteit in het ingespoten en geaspireerd volume tijdens de BAL-procedure (lees verder).

In de literatuur is er controverse omtrent de betrouwbaarheid alsook het klinisch nut van een WBC telling op een BAL vocht.^{3,4,7,8,11,12,15-21}

Een argument tegen de betrouwbaarheid van een WBC telling op BAL vocht is het ontbreken van een wereldwijde standaardisatie van de hoeveelheden gebruikt en gerecupereerd lavagevocht, waardoor er variabele dilutie optreedt.^{6,7,15} Anderen beweren echter dat de WBC telling onafhankelijk is van de hoeveelheid gerecupereerd lavagevocht.^{12,16,19,21,22}

Over het diagnostisch nut van een WBC telling zijn de meningen ook verdeeld gezien de celtelling bij gezonde personen niet normaal verdeeld is en onderhevig is aan verschillende factoren zoals leeftijd, rookgedrag, geslacht, ras alsook de hoeveelheid gerecupereerd lavagevocht.^{17,21} Anderzijds is aangetoond dat WBC telling een meerwaarde heeft in de diagnostiek van ILD.^{19,23} Deze parameter is zelfs opgenomen in een software programma* om de drie meest frequente ILD's (sarcoïdose, extrinsieke allergische alveolitis (EAA) en ideopatisch pulmonaire fibrose (IPF)) van mekaar te kunnen onderscheiden.⁴

Naast de controverse over het nut en betrouwbaarheid van de WBC celling, is er ook discussie over de manier waarop de telling dient te worden verricht, met name via een automatische celteller of een manuele hemocytometer (Fuchs Rosenthal).^{4,7,8,15,17} Argumenten om een manuele hemocytometer te gebruiken zijn dat via een automatische celteller geen onderscheid kan gemaakt worden tussen hematologische cellen en epitheelcellen en andere niet hematologische cellen; dat er een onderschatting van de celtelling kan optreden via automatische celtelling door het groot bereik aan celgroottes, alsook een onderschatting van het aantal macrofagen.^{7,12,14,15,17,24} Via manuele telling kunnen echter ook fouten optreden waaronder variatie in het toegevoegde volume en de snelheid waarmee de telkamer zich vult.¹⁷ Bij automatische celtelling worden grotere volumes geanalyseerd, er worden meer cellen geteld, er is een grotere reproduceerbaarheid, er is minder nood aan expertise en het is minder arbeidsintensief in vergelijking met manuele telling.¹⁷

Ondanks argumenten tegen WBC telling op BAL vocht, wordt door de meesten aanbevolen om de celtelling te rapporteren.^{1,3,4,7,8,12,14,15,17,19} Indien een WBC telling wordt verricht, dan dient dit bij voorkeur op het ongewassen, ongefilterd en niet geconcentreerd staal.^{7,11,14,15} Eventueel kan een zachte

filter worden gebruikt om slijm te verwijderen.⁸ De WBC telling moet worden uitgedrukt als het aantal cellen per milliliter verkregen lavagevocht.^{3,8,12,15-18,24} Om de WBC telling te kunnen rapporteren dient men dus de opbrengst van het gerecupeerd BAL vocht te kennen.³

- Rode bloedceltelling

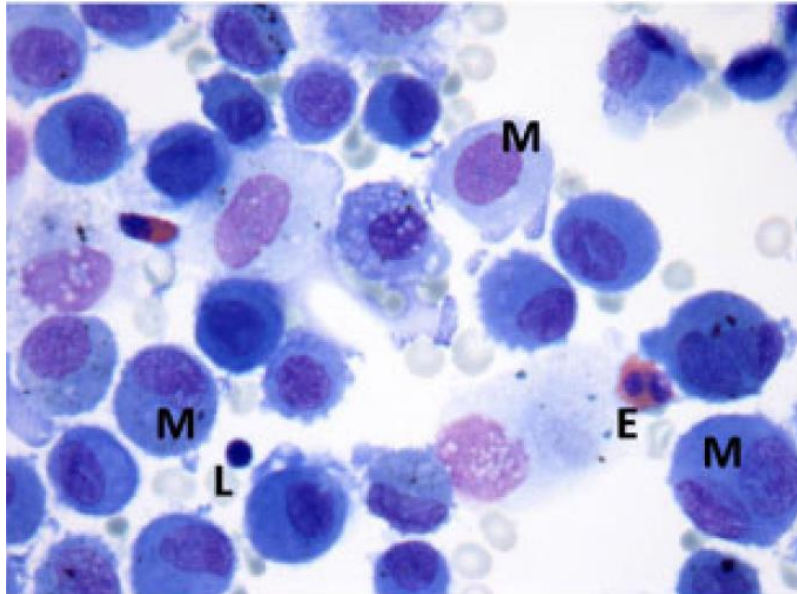
Naast het aantal WBC, wordt het ook aanbevolen om het aantal rode bloedcellen (RBC) te bepalen. Zo kan aan de hand van een WBC/RBC ratio een idee worden verkregen over de mate van bloedbijmenging. De RBC telling moet niet systematisch op het rapport worden genoteerd, maar de aanwezigheid van een verhoogd aantal RBC moet worden vermeld.^{7,8} Een concentratie van 10^6 RBC/mL in BAL vocht is macroscopisch duidelijk zichtbaar en zal de WBC telling (bevat o.a. WBC van het intravasculaire compartiment) alsook de differentiatie beïnvloeden. Het wordt dan ook niet aanbevolen om WBC telling en differentiatie uit te voeren op sterk bijgemengde stalen.

- Witte bloedcel differentiatie

De WBC differentiatie wordt niet beïnvloed door dilutie (uitgedrukt in %) en dient te worden gerapporteerd.⁶ Er wordt geadviseerd om de differentiatie uit te voeren op een cytospin waarbij de celsuspensie een concentratie heeft van $0.5-1 \times 10^6$ /mL. Een cytospin heeft de voorkeur over een uitstrijkje omwille van volgende redenen: 1) kwantitatief voordeel: groter diagnostisch bereik voor detectie van micro-organismen, 2) de kleuring gebeurt gelijkmatig gezien het een monolayer betreft waardoor de inhoud van de cellen en de kernen duidelijk zichtbaar is, 3) een volledig overzicht kan worden verkregen van het preparaat gezien het een klein oppervlak betreft.^{4,14} De ideale opbrengst van de verschillende celsoorten met een uitstekende cytomorfologie wordt bereikt bij een gemiddelde snelheid van 650 rpm gedurende 10 minuten bij een lage acceleratie.⁴ De beste resultaten voor standaard cytologisch onderzoek worden bekomen met MayGrünwald Giemsa kleuring. Perl's kleuring wordt aanbevolen indien blauw-groenachtig granules of bruine partikels worden weerhouden in de macrofagen of PMN's.⁴ Er wordt aanbevolen om 200-500 cellen te tellen voor de WBC differentiatie, met 300 cellen als optimaal getal om een betrouwbare telling te bekomen.^{7,8,11,12,15} Hogere cel aantallen (>500) geven nog steeds geen betrouwbare telling voor mastcellen, plasmacellen en epitheelcellen.⁴ Uitgebreide screening van het preparaat is dan ook aan te bevelen om de aanwezigheid van epitheelcellen (lage vergroting) en plasma cellen (hogere vergroting) te evalueren. De differentiatie gebeurt idealiter rond het centrum van de cytocentrifugatiespot van het preparaat gezien lymfocyten en alveolaire macrofagen niet willekeurig zijn verdeeld.⁴ Het percentage neutrofielen, eosinofielen, lymfocyten, monocyt/macrofagen en mestcellen wordt berekend. Interpretatie van het % mestcellen moet kritisch worden beoordeeld gezien de lagere betrouwbaarheid. Het aantal epitheelcellen (plaveiselcellen en bronchiale epitheelcellen) kan worden weergegeven in % op het aantal gekernde cellen.^{4,7,8} Aanwezigheid van gelyseerde/beschadigde cellen, RBC en intercellulair debris wordt semi-kwantitatief vermeld aan de hand van een gestandaardiseerde score.⁴

BAL vocht samenstelling

Vooraleer een BAL vocht deskundig kan worden geïnterpreteerd, is het belangrijk kennis te hebben van de normale cellulaire samenstelling. Bij gezonde volwassenen bestaat een BAL vocht voor 80-90% uit alveolaire macrofagen, 5-10% lymfocyten en 1-2% neutrofiele en eosinofiele granulocyten en mestcellen. Trilhaarcellen en plaveiselcellen komen minimaal voor in een representatief BAL vocht (0-5%). Grote hoeveelheden van beide type cellen wijzen op contaminatie vanuit de bovenste luchtwegen.⁵ Plasmacellen komen normaal niet voor in een BAL vocht.⁴ Criteria die wijzen op een niet representatief staal zijn: 1) een volume <20 ml, 2) totaal aantal cellen <60000 cellen/mL, 3) >1% plaveiselcellen, 4) >5% bronchiale epitheelcellen, 5) grote hoeveelheden debris, 6) ernstig beschadigde cel morfologie.¹⁴ Omgevingsfactoren zoals roken kunnen de samenstelling van een BAL vocht significant beïnvloeden. Het is dus van belang om bij de interpretatie van een BAL-vocht hieromtrent geïnformeerd te zijn.³ De WBC telling en het aantal neutrofielen zijn meestal hoger en macrofagen kunnen tot 10 keer verhoogd zijn in vergelijking met niet-rokers. De differentiatie verschilt echter weinig tussen rokers en niet-rokers met uitzondering van een lager % lymfocyten.^{7,13,20,25}



Figuur 1: Voorbeeld van een normale samenstelling van de alveolaire fractie van een BAL vocht bij een gezond persoon. M = alveolaire macrofaag, E : eosinofiel, N = neutrofiel, L = lymfocyt¹³

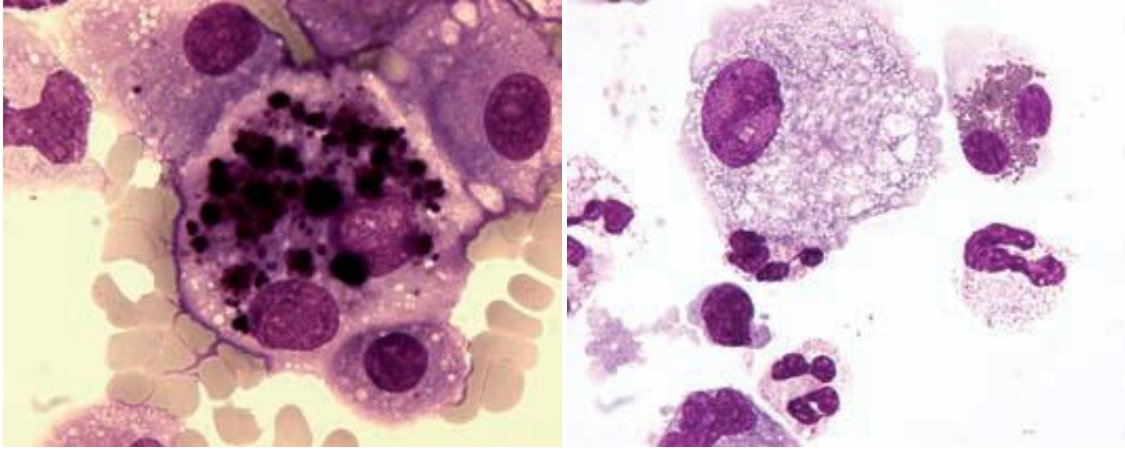
	Niet-rokers		Rokers	
	(x 10 ⁴ cellen/ml)	(%)	(x 10 ⁴ cellen/ml)	(%)
Leukocyten	9.8 (4.7-18.0)	58 (46-69)	19.7 (8.1-45.5)	55 (37-65)
Monocyten	7.5 (4.1-15.9)	85.4 (65.3-95.4)	19 (7.3-44.7)	96.1 (79-98.4)
Neutrofielen	0.2 (0-0.4)	1.3 (0.2-4.3)	0.2 (0-0.7)	0.9 (0.4-3.1)
Eosinofielen	0.03 (0.01-0.33)	0.3 (0.1-3.5)	0.05 (0-0.25)	0.2 (0-1.3)
Mestcellen	0 (0-0.03)	0 (0-0.2)	0	0
Lymfocyten	0.9 (0.3-3.7)	11.7 (3.0-32.4)	0.5 (0.2-1.7)	2.3 (0.7-16.5)
CD3+	0.9 (0.3-3.5)	95 (90-98)	0.6 (0.3-1.5)	96 (87-99)
CD4+	0.5 (0.2-1.7)	54 (35-79)	0.2 (0.1-0.6)	44 (25-58)
CD8+	0.3 (0.04-1.7)	36 (15-57)	0.2 (0.1-0.9)	46 (34-70)
CD4+/CD8+	/	1,5 (0,6-5,5)	/	0,9 (0,4-1,5)
CD19+	0.02 (0.004-0.09)	2 (0.5-3)	0.005 (0-0.05)	1 (0.1-2)
CD3-CD16+CD56+	0.04 (0.02-0.15)	5 (2-8)	0.02 (0.01-0.11)	5 (1-12)

Tabel 1: Referentiewaarden van een WBC telling en WBC differentiatie op een BAL vocht bij volwassenen (18-64 jaar) zonder een longaandoening: niet-rokers versus rokers. Leeftijdafhankelijke waarden voor CD4+/CD8+: >40 jaar versus <30 jaar: mediaan (range) 0,2 (0,02-1,1) versus 0,5 (0,1-2,7)¹³

Onderstaande cellen kunnen worden teruggevonden in een BAL vocht:

- **Alveolaire macrofagen**

Alveolaire macrofagen zijn mononucleaire cellen die in grootte kunnen variëren van 10 tot 40 µm. Ze hebben een ruim, lichtgekleurd cytoplasma dat gelijkmatig verdeeld is rond de kern. De kern is rond tot ovaal en heeft een korrelige structuur. In het cytoplasma kan allerlei gefagocytiseerd materiaal aanwezig zijn, alsook hemosiderine dat door middel van een ijzerkleuring zichtbaar kan worden gemaakt. We spreken over schuimmacrofagen als er veel kleine vacuolen in het cytoplasma aanwezig zijn. Schuimmacrofagen kunnen worden teruggevonden bij een aantal ziektebeelden waaronder medicatie geïnduceerde pneumonitis (vnl amiodarone) en aspiratiepneumonie.^{1,4,5} Bij rokers kunnen met puin beladen macrofagen aanwezig zijn.¹⁸



Figuur 2: Links: alveolaire macrofaag met gefagocyteerd materiaal. Rechts: schuimmacropaag.⁵

- Lymfocyten

Rijpe lymfocyten zijn de kleinste kernhoudende cellen aanwezig in een BAL vocht. Ze hebben een relatief grote ronde kern met af en toe een indeuking en weinig lichtblauw cytoplasma. Een verhoging van het aantal rijpe lymfocyten kan worden gezien bij sarcoidose, maar ook bij infectieziekten, zoals bijvoorbeeld tuberculose. Geactiveerde lymfocyten zijn groter dan de rijpe lymfocyten en bevatten meer cytoplasma (soms gevacuoliseerd en schuimig) en een grilligere celwand.^{4,5}

- Polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten (PMNs)

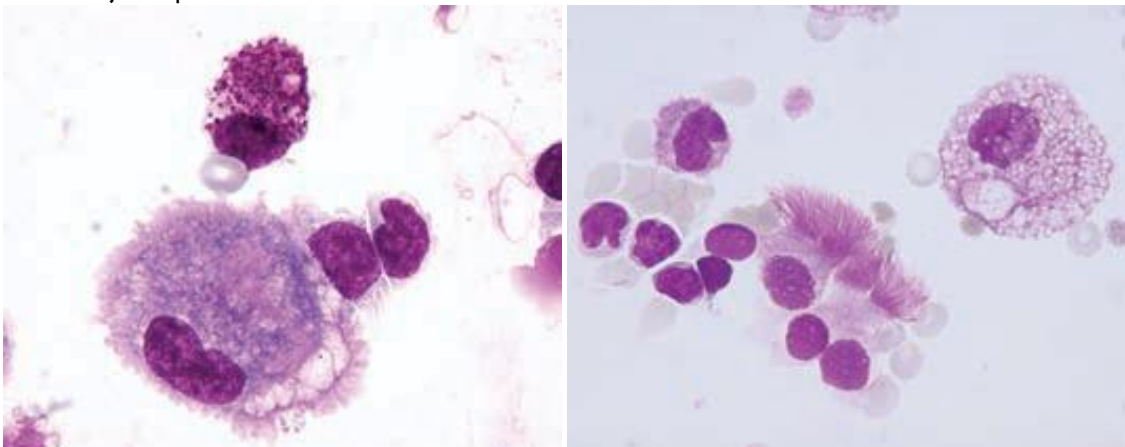
De PMNs variëren in grootte van 12 tot 15 μm . Ze hebben een onregelmatige kern bestaande uit twee tot vijf lobben en een lichtroze cytoplasma met talrijke roze korrels. Pycnotische segmentkernigen zijn kleiner van formaat, met slechts één donker gekleurde celkern. Het zijn gedegenerende cellen die worden gezien bij langdurende inflammatie.⁵ Een verhoogd aantal PMNs kan voorkomen in verschillende klinische omstandigheden, bijvoorbeeld bij pneumocystis carinii pneumonie (PCP), IPF en acute respiratory distress syndroom (ARDS), en het aantal PMNs is gecorreleerd met de ernst van de aandoening.⁴

- Eosinofiele granulocyten

Eosinofiele granulocyten zijn ongeveer even groot als PMNs. Hun kern bestaat meestal uit twee ronde lobben. Het cytoplasma is kleurloos en gevuld met grove oranje-gele korrels. Veel eosinofielen in een BAL vocht kan een indicatie zijn voor astma, allergie, een medicatie geïnduceerde pneumonitis, eosinofiele pneumonie, syndroom van Churg-Strauss, PCP of IPF.^{3,5}

- Basofielen/mestcellen

Basofielen, ook wel mestcellen genoemd, zijn grote cellen met in het cytoplasma blauwe tot paarsrode korrels die de kern geheel bedekken. Ze worden zelden aangetroffen in de BAL vocht, maar kunnen onder andere wijzen op astma of bronchiolitis obliterans.⁵



Figuur 3: Linker figuur: bovenaan: basofiel; rechts: 2 lymfocyten; links: alveolaire macrofaag. Rechter figuur: midden: 3 trilhaarepitheelcellen; rechts boven: schuimmacropaag; links: lymfocyten.⁵

- Bronchiale epitheelcellen

De aanwezigheid van deze cellen geeft een indicatie over contaminatie vanuit de bronchus. Door centrifugatie en kleuring worden deze vaak beschadigd.

o Trilhaarepitheelcellen

Dit zijn cilindervormige cellen met een basaal gelegen kern. De kern heeft een losmazige structuur en is rood gekleurd. Aan de bovenzijde van de cel zijn trilhaartjes aanwezig.

o Slijmbekercellen

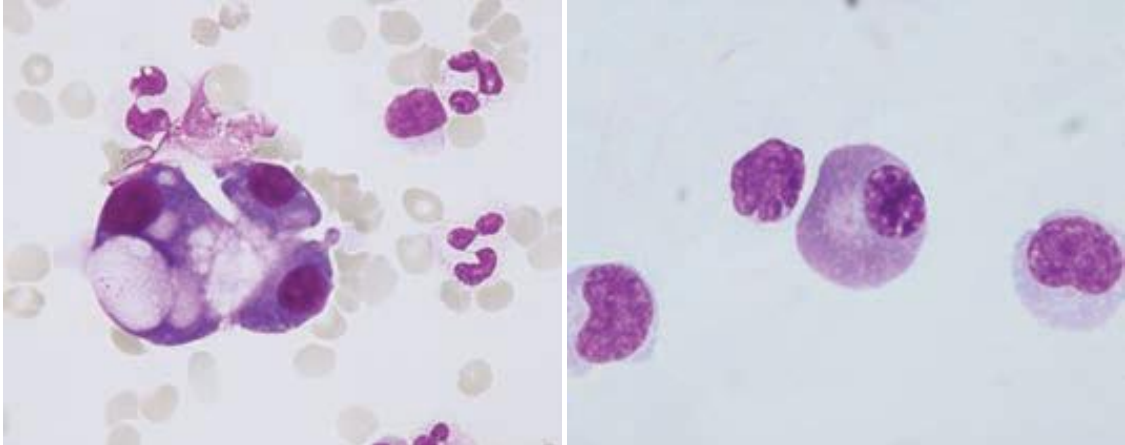
Dit zijn lichte, lange mucus-producerende cellen met een basale kern. Ze zijn vaak moeilijk te herkennen.^{4,5}

- Plaveiselepitheelcellen

Aanwezigheid van deze cellen in een BAL vocht wijst op contaminatie vanuit de mond/keelholte. Het zijn grote, platte, hoekige cellen met een donker gekleurde, relatief kleine kern.^{4,5}

- **Pneumocyten type II**

Pneumocyten type II zijn surfactant producerende cellen die de binnenkant van de alveoli bekleden. Onder normale omstandigheden komen deze cellen niet voor in een BAL vocht of kunnen ze niet worden onderscheiden van macrofagen. In geval van ernstige longschade kunnen ze als reactieve pneumocyten type II (RPII) in een BAL vocht teruggevonden worden. RPII cellen zijn grote cellen met een kleine, donker gekleurde kern die vaak aan de zijkant van de cel ligt. Het cytoplasma is donker gekleurd en bevat grote vacuolen. Meestal liggen deze cellen gegroepeerd. Het onderscheid met maligne cellen is vaak moeilijk. De aanwezigheid van RPII is een aspecifieke indicatie voor ernstige longschade en kan voorkomen bij patiënten met onder andere ARDS, pneumocysten pneumonie veroorzaakt door pneumocystis jiroveci (PJP), ventilator-associated pneumonie (VAP) en alveolaire bloeding.⁵ Ze komen niet voor bij sarcoïdose. Vermoedelijk is dit omdat sarcoïdose een chronisch karakter heeft waardoor het alveolair epitheel niet zo ernstig beschadigd wordt.^{5,12}



Figuur 4: Linker figuur: links: reactieve pneumocyt type II; rechts: neutrofiële granulocyt.. Rechter figuur: in het midden een plasmacel met errond lymfocyten.⁵

- **Plasmacellen**

Plasmacellen hebben een doorsnede van 8 tot 20 µm. Ze hebben een ronde tot ovale excentrisch gelegen kern. Het cytoplasma is intens blauw met een tegen de kern gelegen heldere zone. Plasmacellen komen normaal niet voor in een BAL vocht.⁴ Ze kunnen voorkomen bij PJP, EAA en lymfomen.⁵

BAL vocht rapport

Een BAL vocht rapport voor de clinicus moet bepaalde items bevatten zodat een correcte interpretatie kan worden verricht. Aanbevolen items om te rapporteren zijn: volume van het BAL vocht, macroscopisch uitzicht (kleur, helderheid, consistentie), WBC aantal (µL), vermelding van eventuele bloedbijmenging, differentiatie (% lymfocyten, monocyt/macrofagen, mestcellen, eosinofielen en granulocyten) en resultaten van het manuele microscopisch onderzoek (epitheelcellen (plaveisel-en/of trilhaarepitheel), insluitsels, maligne cellen, schuimmacrophagen, ...).^{7,8} In het laboratorium van AZMM/AZSVD wordt (zoals eerder vermeld) geen WBC en RBC telling gerapporteerd gezien het potentieel dilutie-effect van het spoelvocht bij afname. Het volume BAL vocht en macroscopisch uitzicht worden niet weergegeven. De WBC differentiatie gebeurt manueel op een cytospin waarbij het % lymfocyten, % monocyt/macrofagen, % segmenten en % eosinofielen wordt gerapporteerd alsook een commentaar voor de specifieke morfologische bevindingen indien aanwezig.

Als tweede doelstelling van deze CAT willen we in de specifieke setting van sarcoïdose de waarde van flowcytometrie gaan nakijken gezien er hieromtrent nog controverser is in de literatuur. Tot op heden rapporteren we geen referentiewaarden en geven we geen interpretatie van de resultaten weer op het rapport. Met deze vraagstelling willen nagaan of rapportering hiervan een toegevoegde waarde kan hebben voor de klinici.

QUESTION(S)

- 1) Wat is de specifieke diagnostische waarde van een cytologisch BAL vocht onderzoek in de setting van niet-infectieuze longaandoeningen?
- 2) Een overzicht en analyse van een reeks BAL vochten uit de praktijk. Hoe correleren de cytologische bevindingen in een BAL vocht met de diagnose?
- 3) Wat is de waarde van flowcytometrie bij de diagnose van sarcoïdose en hoe vertaalt zich dit naar de praktijk?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term:

“broncho-alveolar lavage”, “cell count”, “cell differential count”, “flowcytometry”, “CD4/CD8”, “CD103”, “CD56”, “sarcoidosis”, “interstitial lung disease”, “idiopathic interstitial pneumonia”, “extrinsic allergic alveolitis”, “cryptogenic organising pneumonia”, “Langerhans-cell histiocytosis”, “alveolar proteinosis”, “asbestosis”, “silicosis”, “diffuse alveolar bleeding”, “malignancy”, “asthma”, “eosinophilic pneumonia”

- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
“broncho-alveolar lavage”, “cell count”, “cell differential count”, “flowcytometry”, “CD4/CD8”, “CD103”, “CD56”, “sarcoidosis”, “interstitial lung disease”, “idiopathic interstitial pneumonia”, “extrinsic allergic alveolitis”, “cryptogenic organising pneumonia”, “Langerhans-cell histiocytosis”, “alveolar proteinosis”, “asbestosis”, “silicosis”, “diffuse alveolar bleeding”, “malignancy”, “asthma”, “eosinophilic pneumonia”
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>)
- 4) International organizations: e.g. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>)
- 5) UpToDate Online

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)

Haslam PL, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. Eur Respir J. 1999 Aug;14(2):245-8.[6]

Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185(9):1004-1014.[7]

Consensusprotocol voor cytologisch en immunofenotyperings onderzoek op BAL materiaal in het kader van interstitiële longziekten. BAL-werkgroep 2016.

<https://www.skml.nl/uploads/7e/38/7e3890e983d3886843389cf9b33c34d8/Consensusprotocol-voor-onderzoek-op-BAL-materiaal.pdf> [8]

Klech H, Hutter C. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. Eur Respir J 1990;3:937-974.[12]

Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Sep 15;188(6):733-48.[38]

2) Systematic Reviews and Meta-analyses

Shen Y, Pang C, Wu Y, et al. Diagnostic Performance of Bronchoalveolar Lavage Fluid CD4/CD8 Ratio for Sarcoidosis: A Meta-analysis. EBioMedicine. 2016;8:302-308.[51]

3) Reviews

Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 1987;135:250-63.[9]

Baughman RP. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. Semin Respir Crit Care Med. 2007 Oct;28(5):475-85.[11]

<https://www.uptodate.com/contents/basic-principles-and-technique-of-bronchoalveolar-lavage> [15]

Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? *Eur Respir J*. 2011 Oct;38(4):761-9. doi: 10.1183/09031936.00069509.[20]

Cherniack RM, Banks DE, Bell DY, Davis GS, Hughes JM, King TE. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: S169-S202.[21]

Bonella, Francesco & Ohshimo, Shinichiro & Bauer, Peter & Guzman, Johan & Costabel, U. (2010). Bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Mon*. 48.[24]

<https://www.uptodate.com/contents/role-of-bronchoalveolar-lavage-in-diagnosis-of-interstitial-lung-disease> [25]

Meyer KC. The role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med*. 2004 Dec;25(4):637-49, v.[29]

Wuyts W et al. Pitfalls in diagnosis and management of hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* 2015, 21:490-498.[36]

Reynolds HY. Present status of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(5):479-485.[37]

Reynolds HY. Use of bronchoalveolar lavage in humans-past necessity and future imperative. *Lung* 2000;178:271-293.[39]

Rennard SI. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of cancer. *Lung* 1990; 168 Suppl:1035.[46]

Alba MA, Flores-Suárez LF, Henderson AG, Xiao H, Hu P, Nachman PH, Falk RJ, Charles Jennette J. Interstitial lung disease in ANCA vasculitis. *Autoimmun Rev*. 2017 Jul;16(7):722-729. doi: 10.1016/j.autrev.2017.05.008. Epub 2017 May 4.[47]

Govender P, Berman JS. The Diagnosis of Sarcoidosis. *Clin Chest Med*. 2015 Dec;36(4):585-602.[49]

Rijavec M, Volarevic S, Osolnik K, Kosnik M, Korosec P. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respir Med*. 2011;105 Suppl 1:S20-S25.[61]

4) Original Articles

Crystal RG, Reynolds HY, Kalica AR. Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. *Chest*. 1986;90(1):122-131.[1]

Drent M et al. Bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Mon* 2000.[2]

Drent M, Costabel U. Bronchoalveolaire lavage in de diagnostiek van diffuse longaandoeningen. *Ned Tijdschr Geeskd* 1998;49:2661-2665.[3]

Linssen K. Mogelijkheden van de bronchoalveolaire lavage bij de diagnostiek van longaandoeningen. *ILD care Today* 2009;3:18-26.[5]

Heron M, Grutters JC, ten Dam-Molenkamp KM, et al. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(3):523-531.[13]

Helmerts RA, Dayton CS, Floerchinger C, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease: effect of volume of fluid infused. *J Appl Physiol* (1985). 1989 Oct;67(4):1443-6.[16]

Heaney LG, McKirgan J, Stanford CF, Ennis M. Electronic cell counting to measure total cell numbers in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J*. 1994 Aug;7(8):1527-31. doi: 10.1183/09031936.94.07081527.[17]

Domagała-Kulawik J, Skirecki T, Maskey-Warzechowska M, Grubek-Jaworska H, Chazan R. Bronchoalveolar lavage total cell count in interstitial lung diseases-does it matter? *Inflammation*. 2012 Jun;35(3):803-9.[19]

Schildge J, Nagel C, Grun C. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases: does the recovery rate affect the results? *Respiration*. 2007;74(5):553-7.[22]

Welker L et al. Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 2004;24:1000-1006.[23]

Lee W, Chung WS, Hong KS, Huh J. Clinical usefulness of bronchoalveolar lavage cellular analysis and lymphocyte subsets in diffuse interstitial lung diseases. *Ann Lab Med.* 2015 Mar;35(2):220-5.[27]

Kantrow SP, Meyer KC, Kidd P, Raghu G. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997;10:2716-2721.[30]

Heron M, Sliker WA, Zanen P, et al. Evaluation of CD103 as a cellular marker for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Immunol.* 2008;126(3):338-344.[31]

Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest.* 1993;104(2):352-361.[32]

Drent et al. bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *seminars in respiratory and critical care medicine*/volume 28, number 5 2007.[33]

Tutor-Ureta P, Citores MJ, Castejón R, et al. Prognostic value of neutrophils and NK cells in bronchoalveolar lavage of sarcoidosis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70(6):416-422.[35]

Ohshimo S, Bonella F, Cui A, et al. Significance of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:1043.[40]

Vorselaars R. Zeldzame ILD van onbekende oorzaak: cryptogene organiserende pneumonie. *Ildcaretoday* 2019. Jaargang 12(1);23.[41]

Tajiri T, Wada C, Ohkubo H, Takeda N, Fukumitsu K, Fukuda S, Kanemitsu Y, Uemura T, Takemura M, Maeno K, Ito Y, Oguri T, Niimi A. Acute Eosinophilic Pneumonia Induced by Switching from Conventional Cigarette Smoking to Heated Tobacco Product Smoking. *Intern Med.* 2020 Jul 21.[42]

Takizawa Y, Taniuchi N, Ghazizadeh M, et al. Bronchoalveolar lavage fluid analysis provides diagnostic information on pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *J Nippon Med Sch.* 2009;76(2):84-92.[43]

Baqir M, Vassallo R, Maldonado F, Yi ES, Ryu JH. Utility of bronchoscopy in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *J Bronchology Interv Pulmonol.* 2013;20(4):309-312.[44]

Bezel P et al. Diagnostic Value of Bronchoalveolar Lavage for Diagnosis of Suspected Peripheral Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 2016; 17:151-156.[45]

Danila E, Jurgauskiene L, Norkuniene J, Malickaite R. BAL fluid cells in newly diagnosed pulmonary sarcoidosis with different clinical activity. *Ups J Med Sci.* 2009;114(1):26-31.[50]

Danila E, Norkūniene J, Jurgauskiene L, Malickaite R. Diagnostic role of BAL fluid CD4/CD8 ratio in different radiographic and clinical forms of pulmonary sarcoidosis. *Clin Respir J.* 2009 Oct;3(4):214-21.[52]

Reichenberger F, Kleiber B, Baschiera B, et al. Bronchoalveolar lavage quality influences the T4/T8 ratio in sarcoidosis. *Respir Med.* 2007;101(9):2025-2030.[53]

d'Alessandro M, Carleo A, Cameli P, et al. BAL biomarkers' panel for differential diagnosis of interstitial lung diseases [published correction appears in *Clin Exp Med.* 2020 Feb 8;]. *Clin Exp Med.* 2020;20(2):207-216.[54]

Kolopp-Sarda MN, Kohler C, De March AK, Béné MC, Faure G. Discriminative immunophenotype of bronchoalveolar lavage CD4 lymphocytes in sarcoidosis. *Lab Invest.* 2000;80(7):1065-1069.[55]

Sidhu JS, Brar S, Remakus C, Miller J, Santelli E. BALF CD103⁺CD4⁺/CD4⁺ ratio alone is enough to support the diagnosis of sarcoidosis in an appropriate clinicopathologic setting. *Respir Med.* 2016;119:e10-e12.[56]

Mota PC, Morais A, Palmares C, Beltrão M, Melo N, Santos AC, Delgado L. Diagnostic value of CD103 expression in bronchoalveolar lymphocytes in sarcoidosis. *Respir Med.* 2012 Jul;106(7):1014-20. doi: 10.1016/j.rmed.2012.03.020.[57]

Bretagne L, Diatta ID, Faouzi M, et al. Diagnostic Value of the CD103+CD4+/CD4+ Ratio to Differentiate Sarcoidosis from Other Causes of Lymphocytic Alveolitis. *Respiration.* 2016;91(6):486-496.[58]

Hyldgaard C, Kaae S, Riddervold M, Hoffmann HJ, Hilberg O. Value of s-ACE, BAL lymphocytosis, and CD4⁺/CD8⁺ and CD103+CD4+/CD4+ T-cell ratios in diagnosis of sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2012;39(4):1037-1039.[59]

Tanriverdi H, Uygun F, Örnek T, et al. Comparison of the diagnostic value of different lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid in patients with biopsy proven sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2016;32(4):305-312.[60]

5) Reference Works, Handbooks and Databases

De Brauwier E. Standardisation and applications of bronchoalveolar lavage cytology. Proefschrift Maastricht 2000.[4]

Baughman RP. Bronchoalveolar lavage. 1st ed. St Louis: Mosby Year Book, 1992.[10]

Linssen C. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in infectious disorders. Proefschrift Maastricht 2007. <https://www.ildcare.nl/index.php/diagnostic-value-bronchoalveolar-lavage-infectious-disorders/> [14]

Stanzel F. (2013) Bronchoalveolar Lavage. In: Ernst A., Herth F. (eds) *Principles and Practice of Interventional Pulmonology*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4292-9_16 [18]

Interpretation of bronchoalveolar lavage fluid cytology. http://ildcare.nl/Downloads/informatie/bal_cd.pdf [34]

Costabel U, Guzman J, Drent M. Diagnostic approach to sarcoidosis.

<https://www.ildcare.nl/Downloads/artseninfo/Sarcoidosis/Chapter%2017%20Diagnostic%20approach%20to%20sarcoidosis.pdf> [48]

6) Posters, “grey literature”, presentations

<https://www.uzleuven.be/nl/interstitieel-longlijden/soorten-interstitieel-longlijden> [26]

SOP-095 TAB-3c Lichaamsvochtcytologie: bespreking (formule / cellen) – LAG – UZ Leuven (versie 170803) en SOP-096 BLG-6 Werkvoorschrift cytologisch onderzoek van BAL – LAG – UZ Leuven (versie 200226) [28]

*Software programma om de drie meest frequente ILD's (sarcoïdose, extrinsieke allergische alveolitis (EAA) en ideopatisch pulmonaire fibrose (IPF)) van mekaar te kunnen onderscheiden: <https://www.ildcare.nl/index.php/balf-analysis-software/>

APPRAISAL

I. Wat is de specifieke diagnostische waarde van een cytologisch BAL vocht onderzoek in de setting van niet-infectieuze longaandoeningen?

I.1 Voorwaarden voor het gebruik van een BAL vocht in de diagnostiek van niet-infectieuze aandoeningen

De aanbevelingen uit de literatuur omtrent de afname en analyse van een BAL vocht werden hierboven reeds toegelicht. Een BAL vocht heeft een toegevoegde waarde in de diagnostiek van niet-infectieuze aandoeningen, indien het een representatief staal betreft. Hiervoor is het van belang dat zowel de BAL procedure als de verwerking van een BAL vocht op een correcte en gestandaardiseerde manier verlopen. Een BAL vocht kan worden beïnvloed door meerdere omgevingsfactoren, het is dan ook van belang hier kennis van te hebben zodat deze invloeden kunnen worden meegenomen bij de beoordeling en interpretatie. De beoordeling van een BAL vocht vraagt enige expertise en is onderzoekers afhankelijk, daarom is het belangrijk om een duidelijk omschreven analytisch voorschrift te hebben in het laboratorium.

I.2 Klinische toepassingen

De klinische toepassingen voor een cytologisch BAL vocht onderzoek in de setting van niet-infectieuze longaandoeningen hebben we onderverdeeld in volgende diagnostische groepen: ILD, diffuse alveolaire bloeding, maligniteiten en astma (tabel 2). Voor elk van deze diagnostische groepen zullen we nagaan wat de diagnostische waarde is van een cytologische BAL vocht onderzoek.

Diagnostische groep	Formule	Pathologie	Lymfocyten	PMN	Eosinofielen	Macrofagen	Mestcellen	Plasmacellen	Andere
I.2.1 ILD	I.2.2.1 Mengformule / lymfocytair	Sarcoïdose	↑↑	N/↑	N	rozetten	N/↑	-	CD4/CD8 ≥3-3,5
		EAA	↑↑↑	N/↑	N/↑	FAM	↑↑	+/-	CD4/CD8 <1
	I.2.2.2 Mengformule	IIP - IPF	↑	↑/↑↑	↑	N/↑	N/↑	-	<30% lymfocyten
		IIP - COP	↑	↑	↑	FAM	=/↑	+/-	/
		Bindweefsel - aandoeningen	N/↑	↑	N/↑	N/↑	-	-	Afhankelijk van de onderliggende aandoening
		Medicatie	↑/↑↑	↑	↑	FAM	↑↑	+/-	Medicatie afhankelijk
	I.2.2.3 Eosinofiele formule	Acuut/chronisch eosinofiele pneumonie	↑	N/↑	↑↑ (≥40% chronisch; ≥25% acuut)	-	N/↑	+/-	/
	I.2.2.4 Karakteristieke morfologische bevindingen	Langerhans cel histiocytose	N	N	N/↑	N/↑	-	-	LC >5%, anti-CD1a
		Alveolaire proteïnose	↑	N/↑	N	FAM	N	-	Lipoproteïne materiaal
		Stoflongen: asbestose	N	↑↑	↑	N/↑	N	-	Asbestoseli chaampjes
		Stoflongen: silicose	+/-	N	N	N/↑	N	-	Silica partikels
I.2.2 Diffuse alveolaire bloeding	Bloederig	Diffuse alveolaire bloeding	N/↑	↑	N/↑	Hemosiderine en/of RBC in de macrofagen	N	-	HS >100 (ernstige bloeding) Siderofagen ≥20%

1.2.3 Maligniteiten	NVT	Maligniteiten	N/↑	N/↑	N/↑	-	N/↑	-	Maligne cellen afhankelijk van de pathologie
1.2.4 Astma	NVT	Astma	N	N	↑	-	N	-	/

Tabel 2: Overzichtstabel van de beschreven niet-infectieuze longaandoeningen en de bijhorende formule, differentiële celtelling en karakteristieke bevindingen in het BAL vocht. N= normaal, - = afwezig, FAM = foamy alveolar macrophages = schuimmacrofagen^{1,3,25}

1.2.1 Interstitiële longaandoeningen

De meeste niet-infectieuze aandoeningen vallen onder de verzamelgroep interstitieel longlijden (ILD = interstitial lung disease). ILD is een verzamelterm voor meer dan 200 aandoeningen gekenmerkt door ontsteking en fibrose van het interstitium (de ruimte tussen de longblaasjes en de bloedvaten).

De voornaamste aandoeningen binnen ILD zijn IPF, sarcoïdose, EAA (of ook wel hypersensitiviteitspneumonie genoemd), ILD secundair aan systeemaandoeningen zoals reumatoïde artritis en ILD secundair aan medicatie inname. Patiënten met ILD presenteren zich meestal met dyspnee. Soms kunnen er begeleidende symptomen optreden die een aanleiding kunnen geven naar de onderliggende oorzaak. De diagnose wordt meestal gesteld aan de hand van een combinatie van kliniek, labo, beeldvorming (RX thorax/ high resolution computed tomography (HRCT), longfunctietesten, longbiopsie en BAL.^{26,27}

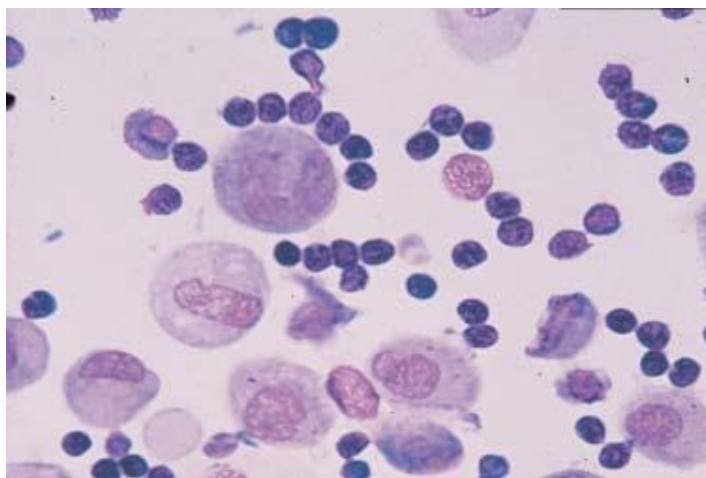
Het celprofiel van een BAL vocht van patiënten met een ILD is vaak niet specifiek en dus niet pathognomonisch. In sommige gevallen is de morfologie wel karakteristiek voor een bepaalde aandoening en kan de diagnose worden vastgesteld of bevestigd. Voor de meest frequente ILD's zoals sarcoïdose en EAA, ziet men dat een differentiële celtelling substantiële diagnostische informatie kan verlenen.^{3,23}

1.2.2.1 Mengformule of lymfocyttaire formule

Een mengformule wordt gedefinieerd als zowel segmenten, lymfocyten en monocytën < 60% en eosinofielen < 10%. Een mengformule met eosinofilie is een mengformule met ≥ 10% eosinofielen. Een lymfocyttaire formule wordt gedefinieerd als: ≥ 80% lymfocyten en een overwegend lymfocyttaire formule als 60-80% lymfocyten²⁸

Sarcoïdose

De totale celtelling in een BAL vocht van patiënten met sarcoïdose is licht gestegen. Bij 90% van de patiënten met sarcoïdose wordt een lymfocytose (≥10-25%) gezien bij diagnose en bij 10-15% van de patiënten is het BAL vocht onderzoek normaal.^{7,29-31} Neutrofielen en eosinofielen zijn meestal normaal in aantal. Bij actieve ziekte is het lymfocytenpercentage hoger dan bij patiënten met een chronische vorm en 'macrofaag rozetten' kunnen worden gezien bij microscopisch onderzoek. Macrofaag rozetten zijn lymfocyten die zich rond macrofagen gaan nestelen. Dit beeld kan echter ook voorkomen bij gezonde rokers en niet-rokers.^{7,32-34} Bij meer gevorderde vormen van sarcoïdose kan een toename van CD8+ T-lymfocyten, neutrofielen (>3%) en mastcellen (>1%) worden weerhouden.^{12,33,35}

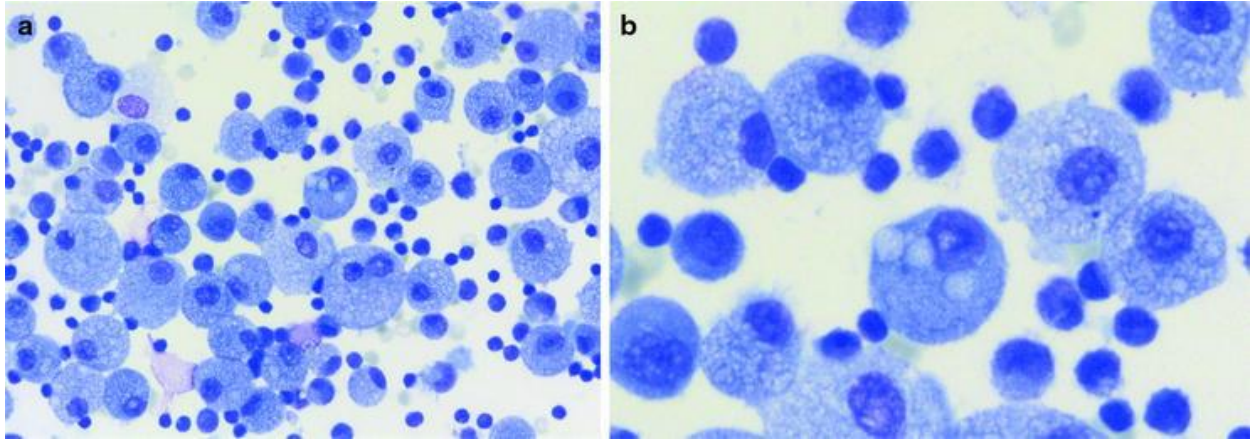


Figuur 5: BAL vocht van een patiënt met sarcoïdose. Lymfocyttaire formule.²⁴

Extrinsieke allergische alveolitis (EAA) of hypersensitiviteits pneumonitis

EAA is een aandoening geassocieerd met de blootstelling aan een antigen waarvoor de patiënt is gesensibiliseerd en die leidt tot een pro-inflammatoire respons in de longen. Bij persisterende blootstelling, kan fibrosevorming optreden. De presentatie varieert van patiënt tot patiënt en is vooral gerelateerd aan de frequentie en intensiteit van blootstelling aan het veroorzakende antigen.³⁶ BAL vocht onderzoek is

een heel gevoelige diagnostische test in deze setting. Deze aandoening heeft het hoogste cel aantal alsook het hoogste lymfocyten percentage van alle ILD's.²⁴ In de acute fase (binnen de week na blootstelling) is de cellulariteit ongeveer vijfmaal verhoogd. Het betreft voornamelijk een lymfocytose (>50%) die vaak ook hoger is dan bij sarcoidose ($\geq 25\%$). Verder kan in de acute fase een milde stijging van de neutrofielen en eosinofielen worden gezien alsook de aanwezigheid van mestcellen (>1%) en plasmacellen.^{12,37} Aanwezigheid van meer dan 5% neutrofielen en eosinofielen kan passen bij chronische ziekte. Alveolaire macrofagen komen heterogeen voor en bevatten vaak vacuolen.¹⁸ De CD4/CD8 ratio kan verlaagd zijn maar diagnostisch is dit geen nuttige parameter.^{7,23}



Figuur 6: BAL vocht van een patiënt met EAA. Talrijke lymfocyten met meerder alveolaire macrofagen die vacuolen bevatten.¹⁸

1.2.2.2 Mengformule

Bij ILD's met een mengformule zonder lymfocytenexces is meer dan één celsoort toegenomen in het BAL vocht. BAL vocht onderzoek is hier meestal niet diagnostisch maar het kan helpen bij het uitsluiten van bepaalde aandoeningen en in combinatie met andere onderzoeken een bijdrage leveren aan de diagnose.

Ideopatische interstitiële pneumonieën (IIP)

Ideopatische interstitiële pneumonieën (IIP) behoren tot de ILD's met ongekende etiologie en worden onderverdeeld op basis van de American Thoracic Society/European Respiratory Society classification (figuur 7). Om een IIP te diagnosticeren is een multidisciplinaire aanpak nodig bestaande uit de clinicus, radioloog, patholoog en klinisch bioloog. Gekende oorzaken van ILD dienen steeds eerst te worden uitgesloten.³⁸

Major idiopathic interstitial pneumonias
Idiopathic pulmonary fibrosis
Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia
Respiratory bronchiolitis-interstitial lung disease
Desquamative interstitial pneumonia
Cryptogenic organizing pneumonia
Acute interstitial pneumonia
Rare idiopathic interstitial pneumonias
Idiopathic lymphoid interstitial pneumonia
Idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis
Unclassifiable idiopathic interstitial pneumonias

Figuur 7: Classificatie van ideopatische interstitiële pneumonieën door de American Thoracic Society/European Respiratory Society.³⁸

❖ Ideopathische pulmonale fibrose (IPF)

De diagnose van IPF kan worden gesteld als andere oorzaken van ILD werden uitgesloten, als er een specifiek patroon (usual interstitial pneumonia) wordt gezien op HRCT bij patiënten die geen longbiopsie ondergingen en als een specifieke combinatie van bepaalde patronen op HRCT en longbiopsie worden weerhouden.³⁸ Er zijn geen specifieke diagnostische kenmerken in een BAL vocht voor IPF. De celdifferentiatie kan ondersteunend werken in de diagnostiek in combinatie met de kliniek en andere technische onderzoeken, alsook helpen bij het uitsluiten van andere longaandoeningen. Toch zijn er bepaalde specifieke patronen in het BAL vocht beschreven die een bijdrage kunnen leveren in de diagnostiek.

Meestal wordt een toename van het aantal neutrofielen gezien, een lymfocytenaantal van <30% (hogere percentages worden meestal niet gezien) en een dominante aanwezigheid van alveolaire macrofagen.^{7,24,39,40} Een combinatie van toegenomen neutrofielen en eosinofielen komt voor bij ongeveer 2/3 van de patiënten. Dit patroon wordt echter ook gezien bij asbestose. Een onderscheid tussen beide aandoeningen kan worden gemaakt door het opsporen van asbestose lichaampjes in de cellen. Hoe meer fibrose op radiologie, hoe hoger het neutrofielenaantal en hoe lager het lymfocytenaantal.¹²

❖ **Cryptogene organiserende pneumonie (COP)**

De term organiserende pneumonie (OP) wordt gebruikt om het proces te beschrijven waarbij granulatiweefsel wordt gevormd in de alveoli. Als er geen oorzaak kan worden gevonden voor dit proces, dan spreekt men over COP. De diagnose van COP is gebaseerd op kliniek, beeldvorming en histopathologie. Indien een BAL vocht onderzoek wordt verricht, dan wordt meestal een mengformule gezien met aanwezigheid van mestcellen, neutrofielen, lymfocyten, eosinofielen, plasmacellen en schuimmacrofagen. Vaak wordt een verhoogd aantal WBC gezien met voornamelijk een toename van de lymfocyten, neutrofielen en soms eosinofielen. In de chronische fase zijn de lymfocyten eerder dominant aanwezig en tijdens de acute fase zijn het voornamelijk de neutrofielen die domineren. De diagnose van een COP kan echter niet met zekerheid worden gesteld op basis van de BAL bevindingen. Wel kan het een hulpmiddel zijn bij het uitsluiten van andere longaandoeningen.^{7,41}

Bindweefselaandoeningen

Deze groep longaandoeningen omvat reumatoïde artritis, Sjögren, Lupus, dermatopolymyositis, mixed connective tissue disease en progressieve systemische sclerose. Bij veel van deze bindweefselaandoeningen ontwikkelen zich inflammatoire processen die meestal resulteren in een diffuus interstitiële longaandoening. Een toename van de neutrofielen met of zonder toename van de eosinofielen en activatie van de macrofagen kan dan worden weerhouden. Een toename van de lymfocyten komt frequenter voor dan bij IPF.²⁴ Een BAL vocht heeft een gelimiteerde waarde bij de diagnostiek van bindweefselaandoeningen. Het kan wel een meerwaarde bieden voor het diagnosticeren van complicaties secundair aan deze longaandoeningen, bv. bloeding en infectie.^{12,24,25}

Medicatie geïnduceerde pneumonitis

Verschillende soorten medicatie kunnen een ILD veroorzaken (bv. amiodarone, methotrexaat, nitrofurantoïne, chemotherapie,...), enerzijds via toxische en anderzijds via immunologische mechanismen.²⁴ Er is geen specifiek morfologisch beeld voor medicatie geïnduceerde pneumonitis. Afhankelijk van de medicatie die werd toegediend, kan echter wel een verschillend beeld worden gezien in het BAL vocht (diffuus alveolaire bloeding, eosinofiele/neutrofiele/lymfocytaire alveolitis, cytotoxische reactie met RPII,...). Een BAL is dus niet diagnostisch voor deze aandoening, maar het kan bijdragen in het uitsluiten van andere longaandoeningen zoals alveolaire bloeding en maligniteit.^{12,25}

I.2.2.3 Eosinofiele formule

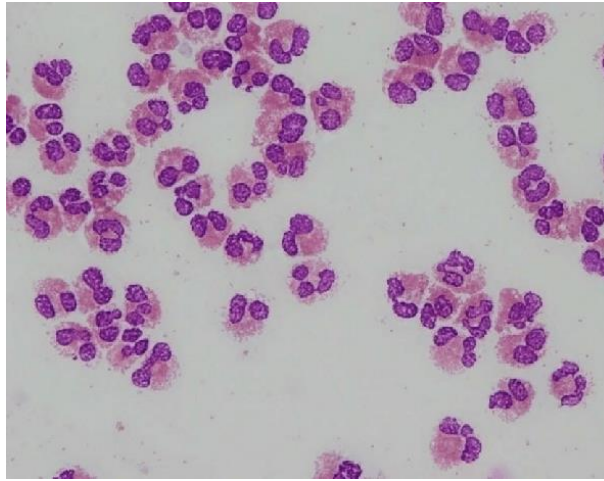
Een eosinofiele formule wordt gedefinieerd als $\geq 10\%$ eosinofielen.²⁸

Alveolaire eosinofilie komt niet voor in een normaal BAL vocht en wijst dus altijd op een pathologisch proces.¹² Een eosinofilie van $\geq 30\%$ is typisch voor een acute/chronische eosinofiele pneumonie. Een eosinofilie van $< 30\%$ kan voorkomen bij verschillende longaandoeningen zoals IPF, sarcoidose, Langerhans cel histiocytose, medicatie geïnduceerde pneumonitis, parasitaire infecties, astma en bindweefselaandoeningen van de longen.^{24,25}

Acuut en chronisch eosinofiele pneumonie

De eosinofilie in het BAL vocht is $\geq 30\%$ en kan soms tot 90% van de cellen bedragen en is ook altijd hoger dan de neutrofilie. Bij een acute eosinofiele pneumonie wordt meestal een eosinofilie van $\geq 25\%$ gezien en bij de chronisch vorm $\geq 40\%$.^{12,25}

De eosinofielen kunnen necrose ondergaan en de granules kunnen dan worden teruggevonden in de alveolaire macrofagen. Soms worden ook mastcellen teruggevonden in het BAL vocht. Een perifere eosinofilie is veelal geassocieerd.

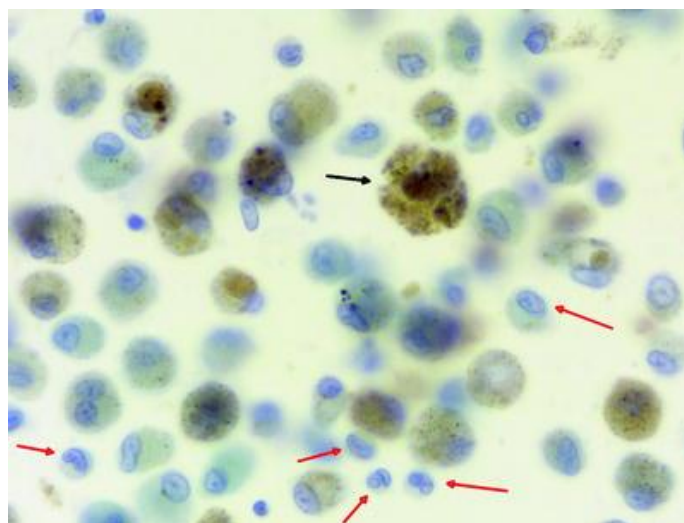


Figuur 8: BAL vocht van een patiënt met acute eosinofiele pneumonie.⁴²

I.2.2.4 Karakteristieke morfologische bevindingen

Langerhanscel histiocytose

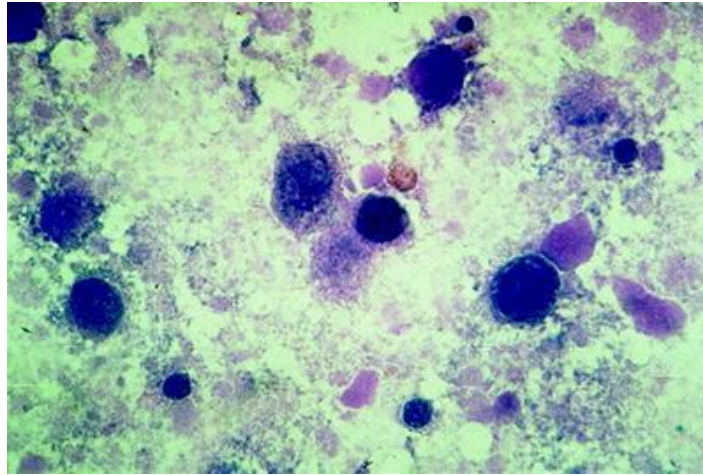
Langerhanscel histiocytose is een zeldzame ILD waarbij Langerhanscellen (LC's) prolifereren in de vorm van een granulomateus letsel. Een LC is een histiocyten met een semicirculaire of brede bandvormige nucleaire morfologie met een diepe en scherpe inkeping.⁴³ De aandoening is sterk geassocieerd met roken en bij BAL vocht onderzoek treft men de typische kenmerken van rokers, met name een verhoogde cel telling en toename van de alveolaire macrofagen met inclusies kan worden weerhouden.^{18,24} LC's tot 1% kunnen voorkomen bij rokers zonder diffuse longaantasting, LC's tot 3% kunnen voorkomen bij verschillende aandoeningen zoals longcarcinoom of meerdere ILD's. Indien LC's > 5% bedragen, dan is er een goede sensitiviteit en specificiteit voor de diagnose van langerhanscel histiocytose. LC's kunnen worden geïdentificeerd met anti-CD1a, deze marker heeft echter een lage sensitiviteit. De diagnostiek kan nog worden aangevuld met een transbronchiale biopsie voor histologische confirmatie.⁴⁴



Figuur 9: BAL vocht van een patiënt gediagnosticeerd met pulmonaire langerhanscel histiocytose. Alveolaire macrofagen met rokers inclusies (met puin beladen macrofagen) (zwarte pijl) en LC's (rode pijl).¹⁸

Alveolaire proteïnose

Alveolaire proteïnose wordt gekarakteriseerd door accumulatie van periodic acid-Schiff (PAS) positief fosfolipiden materiaal in de alveolaire ruimte. De oorzaak van alveolaire proteïnose kan ideopathisch zijn of secundair aan verschillende onderliggende oorzaken. De klinische en radiologische presentaties zijn niet specifiek waardoor alveolaire proteïnose vaak wordt miskend. BAL vocht onderzoek kent een belangrijke plaats in de diagnostiek en het is één van de weinige indicaties waar het de diagnose kan bevestigen en histologisch onderzoek van vervangen.²⁴ Macroscopisch ziet men een melkachtige vloeistof. De totale cel telling is verhoogd. Microscopisch kunnen de karakteristieke acellulaire ovale lichaampjes (surfactant afgeleide lipoproteïnen) worden weerhouden die basofiel voorkomen op een May-Grünwald-Giemsa kleuring en positief zijn met PAS kleuring. Verder kunnen schuimmicrofagen, toegenomen lymfocyten met een verhoogde T-helper/T-suppressor ratio en gestegen neutrofielen worden weerhouden. De achtergrond kenmerkt zich door grote hoeveelheden amorf debris.^{2,12,24}



Figuur 10: BAL vocht van een patiënt met alveolaire proteinose. PAS positieve acellulaire lichaampjes met op de achtergrond grote hoeveelheden amorf debris.¹⁸

Stoflongen

Stoflong of ook wel pneumoconiose, is een ILD ten gevolge van blootstelling aan mineraal stof. Een BAL vocht onderzoek kan de blootstelling bevestigen door het aantonen van stofpartikels in de alveolaire macrofagen.²⁴

- **Asbestose**

Asbestose komt voornamelijk voor bij patiënten die in mijnen of steengroeven werken of hebben gewerkt. Asbeststofdeeltjes veroorzaken littekenweefsel in de longen en belemmeren zo na verloop van tijd de zuurstofwisseling in de longen. Asbestlichaampjes kunnen worden teruggevonden in een BAL vocht. Vaak is er ook een neutrofilie.

- **Silicose**

Silicose komt voornamelijk voor bij granietwerkers.

Silica partikels kunnen worden teruggevonden in de alveolaire macrofagen. Verder kan een lymfocytose worden weerhouden.¹

1.2.2 Diffuse alveolaire bloeding

Een diffuse alveolaire bloeding kan voorkomen bij verschillende aandoeningen en is meestal een levensbedreigende situatie die een snelle diagnose vereist. Een BAL vocht is een goede methode voor de diagnose van diffuse alveolaire bloeding, mede ook voor het opsporen van een onderliggende infectie of maligniteit. Macroscopisch kan het uitzicht variëren van helder tot oranje-roze of rood (bloederig). Een verhoogde cel telling wordt weerhouden. Microscopisch kunnen vrije rode bloedcellen, rode bloedcellen en/of hemosiderine in macrofagen (siderofagen) worden weerhouden. PMN's zijn meestal gestegen met een normaal tot verhoogd aantal lymfocyten. Er kan worden gebruik gemaakt van een hemosiderine score (HS). Deze is gebaseerd op de kleurintensiteit van het cytoplasma van de alveolaire macrofagen op een ijzerkleuring en wordt ook wel Golde score genoemd. Een hoge HS is altijd geassocieerd met de histologische bevinding van een diffuse alveolaire bloeding (HS >100 wijst op een ernstige bloeding). Vrije rode bloedcellen en hemosiderine depositie in macrofagen zijn minder gevoelige bevindingen gezien vrije rode bloedcellen ook kunnen worden teruggevonden bij een traumatische punctie en hemosiderine depositie in macrofagen bij aandoeningen zonder alveolaire bloeding.^{5,12} De Golde score is echter een tijdrovende techniek en daarom kan het aantonen van aanwezigheid van $\geq 20\%$ siderofagen een goed alternatief zijn om de diagnose te bevestigen.²⁴

1.2.3 Maligniteiten

BAL vocht onderzoek wordt niet aanbevolen voor routine diagnostiek van pulmonaire maligniteiten en metastasen van niet pulmonaire maligniteiten (bv. Reed-Sternbergcellen van een Hodgkin lymfoom en metastatische cellen van een borstcarcinoom) gezien de lagere sensitiviteit in vergelijking met histologie.^{45,46} Het kan echter wel een hulpmiddel zijn in de diagnostiek door het identificeren van de aanwezigheid van maligne cellen.² Diffuse maligne infiltraten kunnen in 60-90% van de gevallen betrouwbaar worden gediagnosticeerd. In het geval van een maligne B-cel lymfoom, kan immuunfenotypering de diagnose bevestigen door het aantonen van een monoklonale B-cel populatie. (Bonella) Afhankelijk van het type maligniteit kan de verhouding van de celtypen variëren in het BAL vocht.³

1.2.4 Astma

Er is geen indicatie voor het uitvoeren van een BAL bij vermoeden van astma. Er zijn voldoende objectieve functionele parameters beschikbaar om de diagnose te stellen. De enige indicatie voor het verrichten van een BAL is de aanwezigheid van infiltraten op beeldvorming om een onderliggende aandoening uit te sluiten zoals allergische bronchopulmonale aspergillose.¹² Indien een BAL wordt verricht bij een patiënt met astma, dan kan een toename van de eosinofielen worden gezien in proportie met het serum IgE alsook perifere eosinofilie.¹

Besluit

Een BAL vocht heeft een toegevoegde waarde in de diagnostiek van niet-infectieuze aandoeningen indien het een representatief staal betreft. Hiervoor is een correcte en gestandaardiseerde afname, verwerking en beoordeling van het BAL vocht nodig. Verder is het van belang dat het rapport voor de aanvragende arts voldoende gegevens bevat zodoende een correcte interpretatie kan worden gemaakt. Belangrijk is ook om geïnformeerd te zijn over allerlei factoren zoals leeftijd, rookgewoonte en medicatiegebruik gezien deze een invloed hebben op de samenstelling van het BAL vocht.

Het aantonen van karakteristieke cellen en/of eigenschappen in een BAL vocht kan helpen bij het bevestigen van een vermoedelijke diagnose zoals langerhanscelhistiocytose, diffuus alveolaire bloeding, asbestose, silicose en alveolaire proteïnose. Bij deze aandoeningen zouden invasievere diagnostische methoden zoals een biopsie in een aantal gevallen kunnen worden voorkomen door gebruik te maken van een BAL. Bij de andere ILD's waar geen karakteristieke cellen kunnen worden weerhouden, is het moeilijker om met BAL alleen tot een diagnose te komen. De meeste ILD's vertonen namelijk een niet-specifiek celprofiel (mengformule) met een verhoogde WBC telling. Hier mag een BAL dus niet als geïsoleerd diagnostisch onderzoek worden beschouwd, maar moet het worden meegenomen in de bredere diagnostisch context van kliniek, laboratoriumgegevens, radiologie en eventueel histologie. Ondanks de afwezigheid van die karakteristieke cellen, zijn de meest frequente ILD's zoals sarcoïdose, EAA en IPF toch goed van mekaar te onderscheiden op basis van de sterk verschillende verhouding van de celtypes in het BAL vocht. Een mengformule met $\geq 10-25\%$ lymfocyten wijst in de richting van sarcoïdose in tegenstelling tot een mengformule met $>50\%$ lymfocyten, die suggestief is voor EAA. Een geïsoleerde lymfocytose is zeldzaam bij IPF en in dat geval moeten andere aandoeningen worden uitgesloten.³ Zelfs in gevallen waar het BAL vocht niet diagnostisch is, kunnen de resultaten inconsistent zijn met de verwachte diagnose waardoor men meer gefocuste onderzoeken zal verrichten of het kan bijdragen tot het uitsluiten van bepaalde diagnoses en/of complicaties (bv. maligniteit, diffuus alveolaire bloeding).

2 Een overzicht en analyse van een reeks BAL vochten uit de praktijk. Hoe correleren de cytologische bevindingen in een BAL vocht met de diagnose?

Werkwijze en criteria voor niet-representativiteit

Van 01/06/2020 tot 31/01/2021 hebben we 49 cytospins van BAL vochten afkomstig van drie laboratoria binnen het E17 ziekenhuisnetwerk (AZMM, AZSVD en AZG) retrospectief geanalyseerd. Elk labo heeft zijn eigen procedures voor de verwerking van BAL vochten.

De representativiteit, WBC differentiatie en cytologische bevindingen van deze stalen werden na de routine rapportering door mezelf gecontroleerd voor deze CAT. Voor de manuele microscopische WBC differentiatie werden 200 witte bloedcellen geteld met een vergroting 50x. Indien <200 witte bloedcellen konden worden geteld, dan werd de telling op 100 cellen verricht of werd er genoteerd dat de differentiatie niet mogelijk was gezien te weinig cellen op het cytospinpreparaat. We hebben geen specifieke cutoff waarde gehanteerd voor een lage cytose op de cytospin. Macrofagen/monocyten, lymfocyten, segmenten en eosinofielen werden meegenomen in de differentiatie. Alveolaire macrofagen werden bij de monocyten meegeteld conform de richtlijnen.^{7,8} Aanwezigheid van mestcellen werd semi-kwantitatief beoordeeld en in de commentaar vermeld (zeldzaam of talrijk). Aanwezigheid van volgende elementen werd kwalitatief beoordeeld: alveolaire macrofagen met vermelding van al of niet aanwezigheid van vacuolisatie (schuimmacrofagen) en/of beladenheid, voor maligniteit verdachte cellen met vermelding van de morfologische eigenschappen en aanwezigheid van bacteriën/gisten.

De WBC differentiatie van 2/49 (4%) stalen kwam niet overeen met de differentiatie die werd gerapporteerd. Bij één staal kwam de differentiatie niet overeen gezien de morfologie niet beoordeelbaar was waardoor de differentiatie ook niet betrouwbaar kon worden uitgevoerd. Bij het ander staal werd een lymfocyttaire formule gerapporteerd maar bij tweede controle betrof het een mengformule met 54% lymfocyten in plaats van 80%.

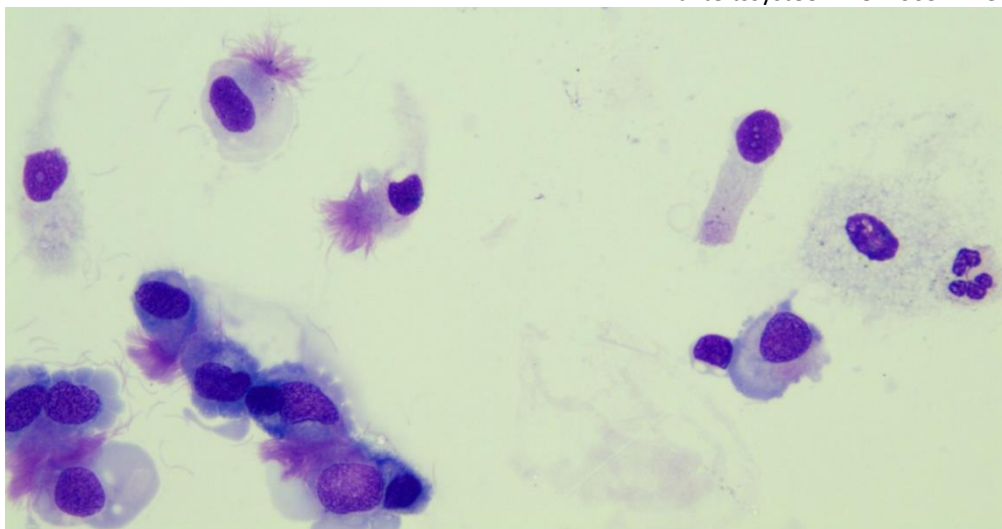
Voor de beoordeling van de representativiteit van het BAL vocht, hebben we criteria toegepast die gebaseerd zijn op volgende bestaande criteria uit de literatuur: 1) een volume <20 ml, 2) totaal aantal cellen <60000 cellen/mL, 3) >1% plaveiselpitheelcellen, 4) >5% bronchiale epitheelcellen, 5) grote hoeveelheden debris, 6) ernstig beschadigde celmorfologie.¹⁴

Deze criteria hebben we aangepast zodat ze konden worden toegepast binnen de huidige praktijkvoering in het laboratorium van AZMM/AZSVD. We hebben geen kennis over het volume gerecupereerd BAL vocht gezien niet al het verkregen volume rechtstreeks toekomt in het laboratorium klinische biologie, een deel wordt rechtstreeks opgestuurd naar de dienst anatomopathologie. Daarom hebben we de eerste twee criteria (volume, totaal aantal cellen) niet meegenomen in de beoordeling van de representativiteit. Verder hebben we ervoor geopteerd om de plaveiselcellen en bronchiale cellen semi-kwantitatief te beoordelen.²⁸

Vijfendertig % (17/49) van de stalen werden als niet representatief beoordeeld op basis van volgende criteria (tabel 3):

- *semi-kwantitatieve beoordeling van de aanwezigheid van trilhaarcellen en plaveiselpitheelcellen: gehanteerde definitie: geen = afwezigheid van trilhaarcellen/plaveiselpitheelcellen, zeldzaam = op enkele velden één, enkele = gemiddeld 1 per 3 velden tot 1 per veld, meerdere = ≥ 5 per veld, talrijke = overheersing van het veld. (Figuur 11) Indien meerdere of talrijke trilhaarcellen en/of plaveiselpitheelcellen aanwezig waren, dan werd dit staal als niet representatief beschouwd.*
- *en/of grote hoeveelheden debris en/of ernstig beschadigde celmorfologie*
- *en/of indien er geen differentiatie mogelijk was gezien te weinig cellen in het preparaat (geen cutoff hiervoor gehanteerd)*
- *beoordeling van de bloederigheid van het staal op een 10 x vergroting (niet bloederig, zeldzame RBC, licht bloederig, matig bloederig, sterk bloederig). Indien de beoordeling van de cytologie werd bemoeilijkt door de bloederigheid van het staal, dan werd dit criterium ook meegenomen in de beoordeling van de representativiteit.*

Bovenstaande criteria werden allen in rekening gebracht om te beoordelen of het preparaat al of niet representatief was.



Figuur 11: Niet representatief BAL vocht met talrijke trilhaarcellen

BAL vocht	Diagnostische groep	Formule	Trilhaarcellen	Plaveisel-epitheelcellen	Debris/gelyseerde cellen	Bloederigheid	Andere
1	ILD	Monocytair	Meerdere	Geen	Gelyseerde cellen	Niet bloederig	/
2		Geen differentiatie mogelijk	Geen	Geen	Geen	Niet bloederig	Geen cellen
3		Mengformule	Talrijk	Zeldzaam	Geen	Niet bloederig	/
4		Geen differentiatie mogelijk	Zeldzaam	Geen	Debris	Sterk bloederig	Amorf materiaal, morfologie moeilijk beoordeelbaar
5		Segmentair	Geen	Geen	Debris + gelyseerde cellen	Matig bloederig	/
6	Maligniteit	Overwegend monocytair	Meerdere	Zeldzaam	Debris + gelyseerde cellen	Niet bloederig	/
7		Mengformule	Meerdere	Geen	Gelyseerde cellen	Niet bloederig	Groepje aberrante cellen
8	Astma	Monocytair	Meerdere	Geen	Gelyseerde cellen	Sterk bloederig	/
9	Inflammatie/ontsteking	Monocytair	Meerdere	Meerdere	Debris + gelyseerde cellen	Niet bloederig	Kiemen, bronchiale cellen, morfologie moeilijk beoordeelbaar
10		Geen differentiatie mogelijk	Meerdere	Meerdere	Debris	Niet bloederig	Enkele segmenten
11		Geen differentiatie mogelijk	Geen	Geen	Geen	Niet bloederig	Geen cellen
12		Overwegend segmentair	Talrijke	Geen	Gelyseerde cellen	Zeldzame RBC	/
13	Infectie	Segmentair	Geen	Geen	Gelyseerde cellen	Sterk bloederig	/
14		Segmentair	Geen	Geen	Debris	Niet bloederig	Morfologie moeilijk te beoordelen
15		Geen differentiatie mogelijk	Meerdere	Meerdere	Debris + gelyseerde cellen	Niet bloederig	/
17		Overwegend monocytair	Talrijke	Geen	Geen	Niet bloederig	/

Tabel 3: Overzicht van de niet-representatieve stalen: diagnostische groep, formule en criteria voor beoordeling niet-representativiteit.

De groep van de representatieve (n = 32) en niet-representatieve (n = 17) BAL vchten werden elk onderverdeeld in 4 diagnostische groepen (zie 1.2 klinische toepassingen: ILD, astma, maligniteit, diffuse alveolaire bloeding). Vier bijkomende diagnostische groepen (infectie, inflammatie/ontsteking, geen diagnose, andere) werden gemaakt om alle BAL vchten correct te kunnen indelen. Om elk BAL vocht de juiste diagnostische categorie te kunnen toewijzen, werd het medisch dossier van de patiënt geraadpleegd. De 49 representatieve en niet-representatieve BAL vchten werden als volgt ingedeeld: 20 ILD's, 4 maligniteiten, 1 astma, 0 diffuse alveolaire bloedingen, 7 inflammaties/ontstekingen, 10 infecties, 3 geen afwijkingen, 2 geen diagnose en 2 andere.

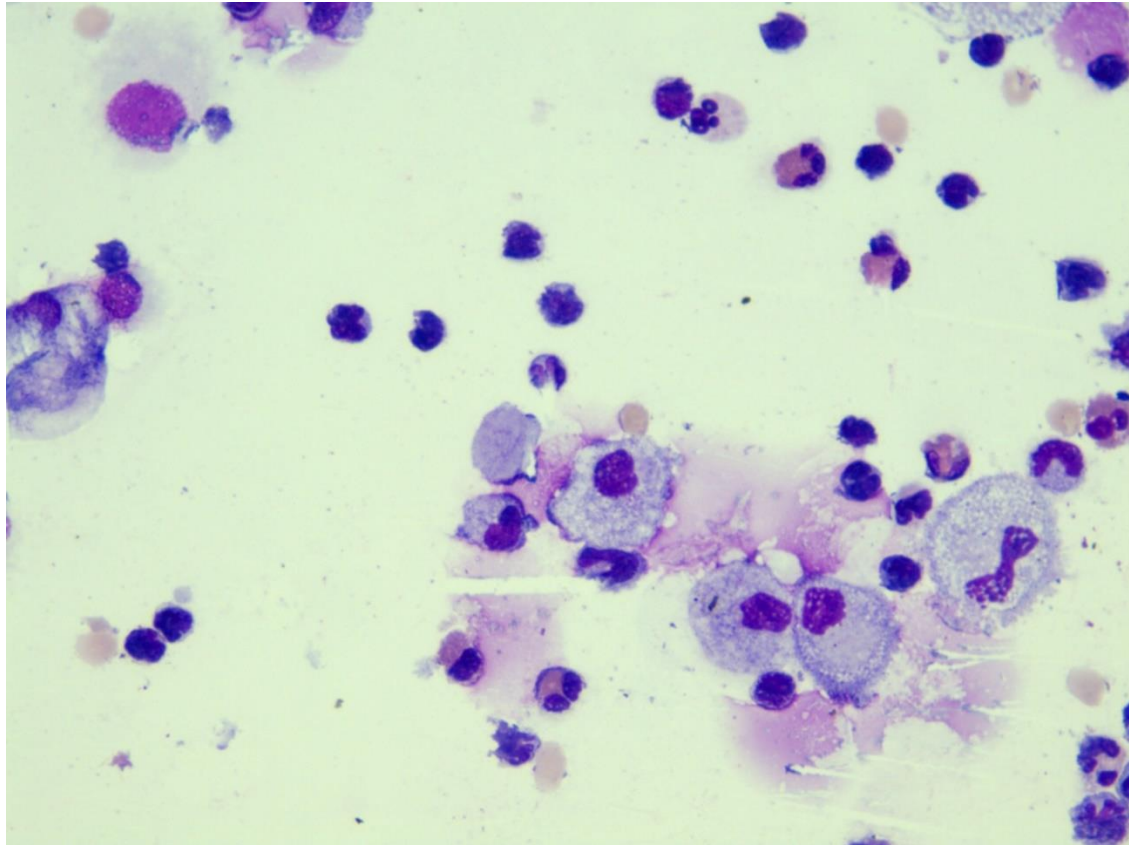
Representatieve BAL vchten

In totaal waren er 65% (32/49) representatieve BAL vchten waarvan 15 ILD's, 0 astma, 2 maligniteiten, 0 diffuse alveolaire bloedingen, 3 inflammaties/ontstekingen, 7 infecties, 1 geen afwijkingen, 2 geen diagnose en 2 andere.

Binnen de groep patiënten met een representatief BAL vocht en gediagnosticeerd met een ILD (n=15), werd de concordantie van formule en specifieke diagnose nagekeken conform de literatuur (tabel 4). Van de andere diagnostische groepen geven we een beschrijvende weergave gezien de concordantie van formule en diagnose bij deze groepen buiten de scope van deze CAT ligt.

ILD (n=15)

- Zes van de 15 patiënten met een ILD werden gediagnosticeerd met een EAA en bij één patiënt was er twijfel tussen de diagnose van IPF en EAA. Van deze 7 patiënten was de formule concordant met de diagnose: we vonden 3 mengformules en 4 (overwegend) lymfocyttaire formules met bij allen $\geq 10\%$ lymfocyten. Bij twee patiënten met een EAA-duivenmelkerslong, was er een eosinofilie aanwezig in het BAL vocht wat specifiek past bij deze diagnose (Figuur 12). De uitlokkende factoren van de andere patiënten met een EAA waren stof, vogels, schimmelvorming en composthoop, allen bevestigd met positieve precipitines. Bij de patiënt met in de differentiaal diagnose EAA en IPF werd geen uitlokkende factor gevonden.
- De BAL vocht formules van de drie patiënten met IPF waren (overwegend) monocytair met dominante aanwezigheid van alveolaire macrofagen wat past bij de diagnose van IPF.⁷
- Sarcoïdose werd gediagnosticeerd bij 1 patiënt met in het BAL vocht een concordante mengformule met $\geq 10\%$ lymfocyten.
- Een BAL vocht werd verricht bij één patiënt in kader van opvolging van een COP, deze toonde een lymfocyttaire formule, passend bij een chronische COP.⁷
- Bij twee patiënten werd een ILD vastgesteld zonder duidelijke kenmerken passend bij een bepaalde categorie (NOS = not otherwise specified). We weerhielden een monocyttaire formule en een mengformule. In de literatuur wordt geen specifieke formule beschreven passend bij deze aandoening.
- Een ILD gerelateerd aan een auto-immune pathologie met name ANCA-geassocieerde vasculitis type microscopische polyangiitis werd vastgesteld bij één patiënt. De BAL formule was overwegend lymfocytair met 7% neutrofielen en 3% eosinofielen. Deze pathologie gaat gepaard met een gestegen WBC telling in het BAL vocht met in $>60\%$ van de gevallen een toename van de neutrofielen en in 20-60% van de gevallen een toename van de lymfocyten en eosinofielen. Diffuus alveolaire bloeding is beschreven bij 50% van deze patiënten met een positieve ijzerkleuring door hemosiderine beladen macrofagen.⁴⁷



Figuur 12: BAL vocht van EAA – duivenmelkerslong. Mengformule met eosinofilie.

Infectie (n=7)

Binnen de groep van patiënten met een representatief BAL vocht (n =32), werd bij zeven een infectie vastgesteld. Vijf van hen hadden een (overwegend) segmentaire formule waarvan 4 patiënten gediagnosticeerd met een bacteriële infectie (bij 2 patiënten werden bacteriën weerhouden op de cytospin). Bij de andere twee patiënten (2/7) werd een mengformule en een overwegend monocyttaire formule gevonden, beide patiënten werden gediagnosticeerd met een PJP. De differentiatie van een BAL vocht van een patiënt met een PJP wordt meestal gekenmerkt door een normaal tot gestegen aantal lymfocyten en eosinofielen, gestegen PMN's en een normaal aantal alveolaire macrofagen.¹⁴ De sensitiviteit van BAL vocht analyse in de diagnostiek van bacteriële infecties ligt tussen 60-90%, voor virale infecties tussen 70-80% en voor PJP $\geq 95\%$.² De formule in een BAL vocht bij een infectieus probleem is afhankelijk van het stadium van de infectie, het aantal PMNs is bijvoorbeeld geassocieerd met de ernst van de infectie.⁴

Maligniteit (n=2)

Twee patiënten werden gediagnosticeerd met een maligniteit: een broncho-alveolair carcinoom en een kleincellig adenocarcinoom van de long. Er werden geen maligne cellen weerhouden in het BAL vocht bij microscopisch onderzoek. Het BAL vocht van de patiënt met een kleincellig adenocarcinoom had een monocyttaire formule en het BAL vocht van de patiënt met een broncho-alveolair carcinoom een overwegend lymfocyttaire formule. Bij een bronchuscarcinoom wordt meestal een normale samenstelling van het BAL vocht gezien.^{3,34}

Inflammatie/ontsteking (n=3), geen afwijkingen (n=1), geen diagnose (n=2), andere (n=2)

Drie patiënten werden gediagnosticeerd met een inflammatie/ontsteking waarbij een segmentaire formule werd gevonden bij één patiënt en bij de andere twee patiënten een mengformule. De patiënt zonder afwijkingen had een segmentaire formule, men verwacht echter een monocyttaire formule bij een gezonde patiënt. Bij 2 patiënten was er een brede differentiaal diagnose en vonden we een overwegend monocyttaire en overwegend segmentaire formule. Twee patiënten werden ingedeeld in de groep andere en hierbij zagen we een mengformule en overwegend segmentaire formule. Bij de patiënt met de mengformule was er persisterend pleuravocht en bij de andere patiënt besloot met tot een status postpneumonie met een persisterende hoest door hypersensitiviteit.

Specifieke diagnose	Formule	Lymfocyten (%)	Concordantie specifieke diagnose en formule
EAA – duivenmelkerslong	Mengformule met eosinofilie	51	Ja
EAA – duivenmelkerslong	Overwegend lymfocytair (13% eosinofielen)	71	Ja
EAA	Lymfocytair	87	Ja
EAA	Mengformule	54	Ja
EAA	Mengformule	29	Ja
EAA	Lymfocytair	85	Ja
EAA dd IPF	Overwegend lymfocytair	72	Ja
IPF	Monocytair	4	Ja
IPF	Monocytair	6	Ja
IPF	Overwegend monocytair	3	Ja
Sarcoïdose	Mengformule	37	Ja
COP	Lymfocytair	82	Ja
ILD NOS*	Monocytair	1	NVT*
ILD NOS*	Mengformule	7	NVT*
ILD ikv auto-immuunpathologie	Overwegend lymfocytair	71	Ja

Tabel 4: Overzicht van de representatieve stalen van patiënten gediagnosticeerd met een ILD (n=15): diagnose, formule, % lymfocyten en concordantie diagnose en formule. *NVT (niet van toepassing): in de literatuur wordt geen specifieke formule beschreven voor ILD NOS.

Besluit

Gezien het belang van de kwaliteit van een BAL vocht voor differentiatie en beoordeling van de cytologie, werd aan de hand van enkele vooropgestelde criteria een voorstel gedaan tot het definiëren van representatieve en niet-representatieve BAL vochten. Vijfenzestig % (32/49) van onze BAL vochten werden beoordeeld als representatief. We vonden geen cijfers terug in de literatuur om onze bevinding mee te vergelijken. Wel wordt in de literatuur gewezen op het belang van standaardisatie van procedures voor het uitvoeren van een BAL en verwerken van een BAL vocht om zo tot een betere kwaliteit te komen van een BAL vocht onderzoek.

In tweede instantie werd in de groep patiënten met een representatief BAL vocht waarbij de diagnose werd gesteld van een ILD, de concordantie van de formule/verhouding van de celtypen nagegaan met de specifieke diagnose. We kunnen besluiten dat in deze groep patiënten, alle formules concordant zijn met de diagnose en dat BAL vocht onderzoek dus een diagnostische bijdrage biedt in de diagnostiek van ILD.

Op basis van de bevindingen uit de analyse uit deze CAT en de aanbevelingen uit de literatuur, zullen we nagaan welke aspecten haalbaar en diagnostisch nuttig zijn om mee te nemen in de bestaande laboprocedures van AZMM/AZSVD alsook voor eventuele finetuning van de rapportering (zie to do / actions).

3 Wat is de waarde van flowcytometrie bij de diagnose van sarcoïdose en hoe vertaalt zich dit naar de praktijk?

3.1 Sarcoïdose

Sarcoïdose is de meest frequente ILD in de Westerse wereld. Het is een chronisch inflammatoire multi-orgaan aandoening met ongekende etiologie. Bij deze aandoening treedt er een accumulatie op van macrofagen en CD4+ T-lymfocyten in verschillende organen maar voornamelijk in de long. Deze immunologisch actieve cellen stellen mediators vrij die op hun beurt nog meer monocyt en macrofagen aantrekken. Het uiteindelijke resultaat zijn niet-verkazende granulomas en een lymfocytose in het BAL vocht met overwegend CD4+ T-lymfocyten.

De diagnose van sarcoïdose berust op aanwezigheid van drie grote criteria: 1) een compatibele klinische presentatie, 2) niet necrotiserende granulomateuze inflammatie in ≥ 1 weefselstaal, 3) de exclusie van andere granulomateuze aandoeningen.⁴⁸ Sarcoïdose is in de meeste gevallen een uitsluitingsdiagnose op basis van kliniek, radiologie, BAL vocht onderzoek en histologie.³¹

Bij 90% van de patiënten met sarcoïdose zien we een lymfocytose (≥ 10 -25%) in het BAL vocht.^{7,27,29,-31,49} Flowcytometrie is pas zinvol als er voldoende lymfocyten aanwezig zijn in het BAL vocht. Waarden van 5-15% lymfocyten zijn beschreven in de literatuur als indicatie voor flowcytometrie.⁷

3.2 Literatuuroverzicht van de belangrijkste cluster of differentiation (CD) markers in de diagnostiek van sarcoïdose

3.2.1 CD4 en CD8

Een normaal BAL vocht bevat voornamelijk T-lymfocyten (CD3+) met een CD4+/CD8+ verhouding tussen 0.9 en 2.5.⁷ De CD4+/CD8+ ratio kan echter worden beïnvloed door verschillende factoren. Bij rokers wordt vaak een hoger cel-aantal gezien en een hoger aantal CD4+ en CD8+ lymfocyten met een lagere CD4+/CD8+ ratio. Symptomatische sarcoïdose patiënten hebben vaker een hoger aantal lymfocyten en een hogere CD4+/CD8+ ratio. Met toenemend ziektestadium ziet men een stijgend aantal CD8+ cellen en een lager aantal CD4+ cellen met een verlaagde CD4+/CD8+ ratio. Behandeling met corticosteroïden kan het aantal lymfocyten en de diagnostische sensitiviteit van de ratio in BAL vocht doen verlagen.⁵⁰⁻⁵² Bij bronchiale contaminatie kan de CD4+/CD8+ ratio ook verlaagd zijn, wat nog eens het belang aantoont van een goeie staalafname.⁵³

De CD4+/CD8+ verhouding is ook leeftijdsafhankelijk met een mediaan van 0.2 (0.02-1.1) >40 jaar en 0.5 (0.1-2.7) <30 jaar.³¹

Bij sarcoïdose is de CD4+/CD8+ verhouding gestegen bij 50-60% van de patiënten, bij 4-15% zien we echter een gedaalde ratio door overheersing van CD8+ cellen. Deze gedaalde ratio wordt vaak gezien bij een meer gevorderd ziektestadium.^{7,12, 30,33,54} In de literatuur is er veel controverse omtrent de waarde van de CD4+/CD8+ ratio in de diagnose van sarcoïdose alsook omtrent de optimale cutoff waarde, die kan variëren van 2 tot 4. Tot op heden zijn er geen internationale standaarden voor de ideale cutoff. In een meta-analyse vond men voor de CD4+/CD8+ ratio een sensitiviteit van 70%, een specificiteit van 83%, een positieve likelihood ratio (LR+) van 4.04 en LR- van 0.36. De area under the curve (AUC) was 0.84 en de diagnostic odds ratio (DOR) 11.17. Deze waarden kunnen zo worden geïnterpreteerd dat CD4+/CD8+ op zichzelf geen goeie analyse is voor de diagnose van sarcoïdose maar dat het een meerwaarde biedt bij het stellen van de diagnose in combinatie met de klinische gegevens en andere diagnostische onderzoeken. De cutoff voor CD4+/CD8+ varieerde tussen 2 en 4 in deze meta-analyse en een meta-regressie toonde geen significant verschil naar diagnostische accuraatheid voor de verschillende cutoff waarden.⁵¹ Zelf kunnen we uit deze meta-analyse besluiten dat de studies die een cutoff waarde tussen 3 en 3.5 hanteren goede positief predictieve waarden hebben. (tabel 5)

Studie	Cutoff	TP	FP	FN	TN	PPV (%)	NPV (%)	Sensitiviteit	Specificiteit
Danila E et al/2009	3.5	254	18	64	167	93	72	0.80 [0.75;0.84]	0.90 [0.85;0.94]
De Smet D et al 2010	2.62	24	21	12	96	53	89	0.67 [0.49;0.81]	0.82 [0.74;0.89]
Fireman E et al 1999	2.5	14	3	0	13	82	100	1.00 [0.77;1.00]	0.81 [0.54;0.96]
Fireman E et al/2006	2.5	51	15	16	38	77	70	0.76 [0.64;0.86]	0.72 [0.58;0.83]
Greco S et al 2005	3.5	48	18	40	58	73	59	0.55 [0.44;0.65]	0.76 [0.65;0.85]
He QY et al 1994	3.5	18	0	3	14	100	82	0.86 [0.64;0.97]	1.00 [0.77;1.00]
Heron M et al/2008	3	38	17	18	46	69	72	0.68 [0.54;0.80]	0.73 [0.60;0.83]

Heron M et al/2008	3	16	2	10	11	89	52	0.62 [0.41;0.80]	0.85 [0.55;0.98]
Hyldgaard C et al/2012	3.8	13	22	6	61	37	91	0.68 [0.43;0.87]	0.73 [0.63;0.83]
Korosec P et al/2010	3.3	33	1	14	7	97	33	0.70 [0.55;0.83]	0.88 [0.47;1.00]
Lee W et al/2015	2.16	11	9	1	48	55	98	0.92 [0.62;1.00]	0.84 [0.72;0.93]
Marruchella A et al/2002	3.5	30	5	21	33	86	61	0.59 [0.44;0.72]	0.87 [0.72;0.96]
Smith PA et al/2006	2.3	10	2	4	10	83	71	0.71 [0.42;0.92]	0.83 [0.52;0.98]
Suchankova M et al/2013	3.5	18	1	8	26	95	76	0.69 [0.48;0.86]	0.96 [0.81;1.00]
Von Bartheld MB et al/2013	3.5	73	1	63	12	99	16	0.54 [0.45;0.62]	0.92 [0.64;1.00]
Winterbauer RH et al/1993	4	20	17	7	84	54	92	0.74 [0.54;0.89]	0.83 [0.74;0.90]
Yao Q et al/2008	4	28	3	13	7	90	35	0.68 [0.52;0.82]	0.70 [0.35;0.93]

Tabel 5: Overzicht van de sensitiviteit, specificiteit, positive predictive value (PPV) en negative predictive value (NPV) voor de verschillende cutoff waarden van de CD4+/CD8+ ratio in BAL vocht van de artikels geïnccludeerd in de meta-analyse van Shen et al.⁵¹

3.2.2 CD103

Gezien er nog longaandoeningen zijn met overheersend CD4+ cellen, is verder onderzoek verricht naar bijkomende merkers om een beter onderscheid te kunnen maken met sarcoïdose. CD103 is een integrine, betrokken in het rekruteren van lymfocyten naar en van het longepitheel. CD103 wordt geëxprimeerd door lymfocyten in het bronchiaal epitheel en door sommige alveolaire wand lymfocyten en T-lymfocyten in de bronchiale vloeistof. Het medieert de binding van E-cadherine aan de basolaterale zijde van het epitheel.³¹ CD103 wordt geëxprimeerd door 95% van de intraepitheliale lymfocyten in de mucosa en door <2% van de circulerende lymfocyten.⁵⁴ De CD4+ lymfocyten bij patiënten met sarcoïdose zijn afkomstig van het perifeer bloed (in tegenstelling tot EAA), wat een verklaring biedt voor de afwezigheid van CD103 op de CD4 positieve cellen in BAL vocht bij deze pathologie.³¹ In de literatuur is er nog discussie omtrent het nut van CD103 bij de diagnose van sarcoïdose. Sommige studies beweren dat een gedaald aantal CD103+ lymfocyten en een gedaalde CD103+CD4+/CD4+ ratio goede merkers zijn om sarcoïdose te onderscheiden van andere (interstitiële) longaandoeningen, op voorwaarde dat er een alveolaire lymfocytose aanwezig is (>10%).^{31,55-57} Indien een CD4+/CD8+ ratio van >3 gecombineerd wordt met CD103+CD4+/CD4+ <0.2, dan heeft dit een sensitiviteit van 66% en specificiteit van 89%.³¹ Bij een verschillend ziektestadium kan een verschillend aantal CD103+CD4+ cellen worden weerhouden. Een hoger radiologisch stadium zou gecorreleerd zijn met een hoger aantal CD103+CD4+ cellen wat impliceert dat CD103 kan helpen in het onderscheiden van een acute fase van een chronische fase die overgaat in een fibrotische vorm.^{31,56,57} Er zijn echter andere studies die zeggen dat er geen toegevoegde waarde is van CD103+CD4+/CD4+.⁵⁸⁻⁶⁰ In een studie van Tanriverdi et al zag men verlaagde waarden van CD103+CD4+ en CD103+CD4+/CD4+ bij patiënten met sarcoïdose, deze waarden waren echter niet significant in vergelijking met niet sarcoïdose patiënten.⁶⁰ De cutoff waarden variëren in de verschillende artikels in beperkte mate, namelijk tussen 0.31-0.4 voor CD103+/CD4+ en tussen 0.2-0.22 voor CD103+CD4+/CD4+. Bij patiënten met sarcoïdose en een verlaagde CD4+/CD8+ ratio, kan een relatieve CD4+/CD8+ ratio worden toegevoegd.³¹ Dit is een ratio van CD4+/CD8+ in BAL ten opzichte van CD4+/CD8+ in perifeer bloed met een cutoff van 2. Indien deze relatieve ratio wordt gecombineerd met de CD4+/CD8+ ratio (>3) en CD103+CD4+/CD4+ (<0.2), dan wordt een sensitiviteit van 66%, een specificiteit van 89%, PPV van 82% en NPV van 74% gezien.³¹

3.2.3 CD56

Over de interpretatie van NK-cellen in BAL vocht bij patiënten met sarcoïdose is er nog geen consensus in de literatuur. Sommige studies beweren dat het aantal CD56+ cellen verlaagd is, terwijl anderen beweren dat het aantal verhoogd is en dat de graad van verhoging geassocieerd is met het ziektestadium en een slechtere outcome.^{35,60,61} In het algemeen worden vaak verhoogde waarden gezien voor CD56 in een BAL vocht. Deze verhoging is niet specifiek voor een bepaald ziektebeeld, het kan voorkomen bij onder andere EAA, eosinofiele pneumonie en IPF.

3.2.4 Toepassing in de praktijk

Van 01/01/2019 tem 31/01/2021 hebben we 81 BAL vochten in het laboratorium van AZMM-AZSVD ontvangen en vanaf 01/06/2020 ontvingen we 22 cytopspins van BAL vochten van AZ Groeninge Kortrijk voor deze CAT. Op 51 van de 103 stalen (50%) werd flowcytometrie aangevraagd door de clinicus waarbij volgende CD merkers worden geanalyseerd: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD103, humaan leukocyten antigen DR (HLA-DR) en CD1a. Van de stalen waar er flowcytometrie werd op uitgevoerd, werd de diagnose opgezocht in het medisch dossier. Slechts bij 2 patiënten waarbij flowcytometrie werd verricht, werd de diagnose van sarcoïdose gesteld en slechts één van deze patiënten voldeed aan de vooropgestelde criteria voor de diagnose van sarcoïdose door

Contact: Dienstsecretariaat tel: 016 34 70 19

middel van flowcytometrie ($CD4+/CD8+ >3-3,5$ en $CD103+C4+/CD4+ <0,2$). Onze patiëntenpopulatie was te klein om een besluit te kunnen vormen omtrent de bruikbaarheid van flowcytometrie in de diagnose van sarcoïdose.

Besluit

Sarcoïdose is in de meeste gevallen een uitsluitingsdiagnose en berust op een combinatie van kliniek, radiologie, histologie en cytologisch/flowcytometrisch onderzoek van een BAL vocht. Een goede staalafname is hierbij essentieel. Cytologisch onderzoek en flowcytometrie op zichzelf zijn onvoldoende om de diagnose van sarcoïdose te kunnen stellen maar zijn coherent aan de andere diagnostische bevindingen. Indien er klinische en radiologische argumenten zijn voor sarcoïdose dan kunnen de bevindingen van een lymfocytose ($>10-25\%$) in combinatie met een gestegen $CD4+/CD8+$ verhouding en gedaalde $CD103+CD4+/CD4+$ ratio ($<0,2$) in BAL vocht, een aanvulling zijn op de diagnose.^{7,23,27,29-31} Er zijn geen internationale standaarden voor de cutoff van $CD4+/CD8+$ maar uit ons literatuuronderzoek kunnen we besluiten dat waarden tussen 3 en 3,5 geassocieerd zijn met goede positieve predictieve waarden en als cutoff kunnen worden gebruikt. De $CD4+/CD8+$ ratio kan echter beïnvloed worden door verschillende factoren die mee in rekening moeten worden gebracht bij de interpretatie.

Er zijn patiënten beschreven met een lagere of afwezige lymfocytose alsook patiënten met een gedaalde $CD4/CD8$ verhouding. Hierbij kan het nuttig zijn aanvullend de $CD4+/CD8+$ ratio te bepalen op perifeer bloed. $CD4+/CD8+$ BAL/PB >2 in combinatie met een lage $CD4+/CD8+$ ratio kan gelijk worden gesteld aan een gestegen $CD4+/CD8+$ ratio.³¹ Onze patiëntenpopulatie was te klein om een besluit te kunnen vormen omtrent de bruikbaarheid van flowcytometrie in de diagnose van sarcoïdose.

COMMENTS**To do/ACTIONS**

- 1) Overleg met de pneumologen van AZMM/AZSVD over verdere oppuntstelling in de huidige workflow/rapportering die voor hen van klinisch diagnostisch nut zijn op basis van de bevindingen uit deze CAT.
- 2) SOP body fluids en flowcytometrie (voor de diagnostiek van sarcoïdose) aanpassen in functie van de haalbaarheid (operationele/ rapportering) en in functie van het overleg met de pneumologen en klinisch biologen van AZMM/AZSVD.
- 3) Finetuning rapportering BAL vocht onderzoek. Attachment 1 toont een voorbeeld van de huidige rapportering in AZMM/AZSVD. Attachment 2 toont een voorbeeld van een voorstel voor aanpassing van de rapportering op basis van deze CAT. Op basis van de suggesties van de pneumologen en de klinisch biologen na overleg en na de mondelinge CAT presentatie kan deze rapportering nog worden bijgesteld. Volgende mogelijke aanpassingen voor de rapportering zijn voorgesteld in attachment 2 met telkens de pro' en de contra's:
 - Het al of niet rapporteren van het gerecupereerd volume BAL vocht en de witte en rode bloedcel telling.
 - o Pro:
 - Meerwaarde aangetoond van WBC telling in de diagnostiek van ILD (zie clinical/diagnostic scenario – BAL vocht verwerking).
 - o Contra:
 - Verdeling van het gerecupereerd BAL vocht: een deel gaat rechtstreeks naar de dienst anatomopathologie bij aanvraag door de clinicus waardoor het laboratorium klinische biologie geen zicht heeft op het totaal verkregen volume. Het gerecupereerd BAL vocht wordt verzameld in plasticen potjes zonder maataanduiding (zie foto attachment 3) waardoor het ook geen mogelijkheid is om het totale volume door te clini te laten noteren. Gezien het wordt aanbevolen de rapportering van de WBC telling als aantal cellen/mL verkregen lavagevocht weer te geven, komt dit deze rapportering ook in gedrang aangezien hiervoor het volume vereist is.
 - Controverse in de literatuur omtrent de betrouwbaarheid en het klinisch nut van een WBC telling op een BAL vocht alsook omtrent de manier waarop de celtelling dient te worden verricht (manueel vs automatisch) (zie clinical/diagnostic scenario – BAL vocht verwerking).
 - Indien BK aanvraag dan geen mogelijkheid om de witte en rode bloedcel telling op de automatische celteller te verrichten gezien het risico op contaminatie. Eventueel manuele celtelling mogelijk onder de laminaire flow kast.
 - Voorstel tot gebruik van vaste commentaren voor de definiëring van de formule en rapportering van de belangrijkste cytologische bevindingen met ook nog mogelijkheid tot het noteren van vrije commentaren.
 - o Pro:
 - Diagnostische meerwaarde aangetoond van de formule van een BAL vocht in de diagnostiek van ILD.
 - o Contra:
 - Bevoegdheid klinisch bioloog voor rapportering
 - Wie beoordeelt en rapporteert de BAL vochten: domeinbioloog vs dienstdoende bioloog
 - Nood aan kwaliteitsbewaking (interpersonele toetsing)
 - Beoordeling van de representativiteit op basis van de criteria vooropgesteld in deze CAT.
 - o Pro:
 - Diagnostisch meerwaarde voor de clinicus
 - o Contra:
 - Bevoegdheid klinisch bioloog voor rapportering
 - Wie beoordeelt en rapporteert de BAL vochten: domeinbioloog vs dienstdoende bioloog
 - Nood aan kwaliteitsbewaking (interpersonele toetsing)
 - Cutoff waarden hanteren voor CD4+/CD8+ en CD103+C4+/CD4+ voor de diagnose van sarcoïdose
 - o Pro:
 - Diagnostische meerwaarde voor de clinicus bij vermoeden van sarcoïdose
 - o Contra:

- Geen internationale standaarden beschikbaar voor de cutoff van CD4+/CD8+. (Cutoff waarde van 3-3,5 gebaseerd op literatuuronderzoek.)
- CD4+/CD8+ ratio kan beïnvloed worden door verschillende factoren die mee in rekening moeten worden gebracht bij de interpretatie

4) Twee mineure acties:

- Mineure actie: vergelijking van het resultaat van de kwaliteit van de cytopins met de huidige instellingen (1500 rpm, 5 minuten, gemiddelde versnelling) en de instellingen vooropgesteld in de literatuur (650 rpm, 10 minuten, lage versnelling)
- Mineure actie: differentiatie verrichten op 200 cellen (in plaats van 100 cellen) conform de literatuur waarbij twee cytopins dienen te worden beoordeeld (in plaats van één cytopin).

ATTACHMENTS

Attachment I: Huidige rapportering van een BAL vocht onderzoek in AZMM-AZSVD.

IMMUNOFENOTYPERING**Bronchopulmonair staal**

T-lymfocyten (CD3+)	16	%
B-lymfocyten (CD19+)	2	%
T-helper lyfmo (CD3+/CD4+)	19	%
T-cytotox. (CD3+/CD8+)	5	%
BAL T-lymfocyten (CD103+/CD4+)	4	%
Verhouding CD4/CD8	3.80	
Verhouding (CD103+CD4+)/CD4+	0.21	
CD45	100%	

BAL VOCHT

Segmenten	!	1	%
Lymfocyten	!	22	%
Monocyten	!	77	%
Eosinofielen		0	%
Commentaar	!	Talrijke puinmacrofagen.	

Attachement 2: Suggestie voor aanpassingen aan de rapportering van een BAL vocht onderzoek in AZMM-AZSVD (ter bespreking)**Volume** (ml)**WBC telling** (aantal cellen/mL)**RBC telling** (/μL)**Formule**

Segmenten (%)

Lymfocyten (%)

Monocyten/macrofagen (%)

Eosinofielen (%)

Mastcellen: apart te vermelden indien aanwezig

Commentaar/ interpretatieVaste commentaar voor de formule

- ✓ Mengformule (< 60 % segmenten, lymfocyten en monocyten en < 10 % eosinofielen)
- ✓ Mengformule met eosinofilie (< 60 % segmenten, lymfocyten en monocyten en ≥ 10 % eosinofielen)
- ✓ Segmentaire formule (≥ 80 % lymfocyten)
- ✓ Overwegend segmentaire formule (60-80 % segmenten)
- ✓ Lymfocyttaire formule (≥ 80% lymfocyten)
- ✓ Overwegend lymfocyttaire formule (60-80 % lymfocyten)
- ✓ Monocyttaire formule (≥ 80% monocyten)
- ✓ Overwegend monocyttaire formule (60-80 % monocyten)
- ✓ Indien er minder dan 200 cellen kunnen worden geteld: reserve voor beoordeling, differentiatie op # aantal WBC.
- ✓ Indien er te weinig cellen zijn voor differentiatie dan beschrijvend werken: bijvoorbeeld enkele lymfocyten waargenomen

Vaste commentaar voor beoordeling representativiteit (op basis van de criteria vooropgesteld in deze CAT)

- ✓ Representatief BAL vocht
- ✓ Niet representatief BAL vocht

Vaste commentaar voor andere cytologische bevindingen (meerdere antwoorden mogelijk):

- ✓ Aanwezigheid van schuimmacrofagen
- ✓ Aanwezigheid van beladen macrofagen
- ✓ Aanwezigheid van intracellulaire bacteriën
- ✓ Voor gist verdachte structuren
- ✓ Voor maligniteit verdachte cellen
- ✓ Mogelijkheid tot vrije commentaar voor andere cytologische kenmerken: bijvoorbeeld aanwezigheid van asbestlichaampjes

Flowcytometrie

T-lymfocyten (CD3+)

B-lymfocyten (CD19+)

T-helper lymfo (CD3+/CD4+)

T-cytotox. (CD3+/CD8+)

BAL T-lymfocyten (CD103+/CD4+)

Verhouding CD4+/CD8+

(≥ 3-3,5)*

Verhouding CD103+CD4+/CD4+

(< 0,2)*

*Cutoff waarden in de diagnostiek van sarcoidose

Attachment 3: BAL vocht recipiënt

