
Mogelijkheden van de bronchoalveolaire lavage bij de diagnostiek van longaandoeningen

De diagnostiek van longaandoeningen is erg complex. Met behulp van een combinatie van klinische symptomen, laboratoriumuitslagen, beeldvormende technieken en longfunctiemetingen wordt uiteindelijk diagnose gesteld. Analyse van bronchoalveolaire lavage (BAL) vloeistof kan, mits goed uitgevoerd en geïnterpreteerd, hierbij van toegevoegde waarde zijn.

DOOR DR. KITTY LINSSEN

Microscopie en de differentiële celtelling van BAL-vloeistof kan bruikbare informatie leveren voor de diagnose van zowel infectieuze als niet-infectieuze aandoeningen (tabel 1). In dit artikel wordt de nadruk met name gelegd op de microscopie van BAL-vloeistof, specifiek op de differentiële celtelling en welke informatie hieruit verkregen kan worden (tabel 2). Voor de differentiële celtelling wordt in het Maastricht Universitair Medisch Centrum (MUMC) een May-Grünwald Giemsa (MGG) kleuring gebruikt.

Cytologische samenstelling van de BAL

Een eerste vereiste voor het interpreteren van een differentiële celtelling van BAL-vloeistof is kennis van de normale samenstelling van BAL-vloeistof. De celpopulatie van de

BAL bij gezonde personen bestaat voor 80 tot 90 procent uit alveolaire macrofagen, 5 tot 10 procent van de cellen zijn lymfocyten en de resterende 1 tot 2 procent bestaat uit polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten, eosinofiele granulocyten en mestcellen. In een kwalitatief representatieve BAL-vloeistof is de aanwezigheid van trilhaarepithelcellen en plaveiselepithelcellen minimaal. Indien er een grote hoeveelheid van bovengenoemde cellen aanwezig is, duidt dit op contaminatie vanuit de bovenste luchtwegen en is derhalve de differentiële celtelling minder betrouwbaar. De aanwezigheid van trilhaarepithelcellen en plaveiselepithelcellen kan samen met de totale celtelling en het volume van de verkregen BAL-vloeistof gebruikt worden als een kwaliteitscontrole.

Alveolaire macrofagen

Alveolaire macrofagen (AM, figuur 1 en 5) zijn mononucleaire cellen die in grootte kunnen variëren van 10 µm tot



Catharina (Kitty) Linssen (1974)

studeerde geneeskunde aan de Universiteit van Maastricht. In 2006 ronde ze haar specialisatie tot arts-microbioloog af in het Maastricht Universitair Medisch Centrum. Een jaar later

*promoveerde ze op het proefschrift getiteld: 'Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in infectious disorders'. Momenteel werkt ze als arts-microbioloog in het Maastricht Universitair Medisch Centrum waar ze haar onderzoek naar het gebruik van BAL bij longaandoeningen voortzet.
e-mail: cfm.linssen@mumc.nl*

40 µm in doorsnede. Ze hebben veel, 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, waaronder koolstof, micro-organismen, cellen, allerlei debris (figuur 2) maar ook hemosiderine (figuur 3) dat door middel van een ijzerkleuring zichtbaar gemaakt kan worden. Bij een aantal ziektebeelden (waaronder drug-induced pneumonitis) kunnen macrofagen vele, kleine vacuolen bevatten in hun cytoplasma, deze worden dan schuim-macrofagen (ofwel 'foamy alveolar macrophages') genoemd (figuur 4 en 6).

Lymfocyten

Rijpe lymfocyten (Lym, figuur 4, 5 en 6) zijn de kleinste kernhoudende cellen aanwezig in de BAL-vloeistof. Ze hebben een relatief grote kern en weinig cytoplasma. De kern is rond met af en toe een indeuking en donkerpaars gekleurd. Vaak is alleen een dun randje lichtblauw cytoplasma zichtbaar. Een verhoging van het aantal rijpe lymfocyten is onder andere te zien bij sarcoïdose, maar ook bij infectieziekten, zoals bijvoorbeeld tuberculose. Geactiveerde lymfocyten zijn groter dan de rijpe lymfocyten en bevatten meer cytoplasma dat richting de celwand vaak donker van kleur wordt, bovendien is de celwand vaak grilliger van vorm.

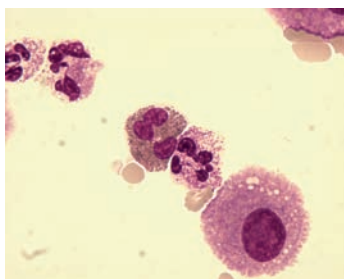
Table 1. Samenvatting van bruikbaarheid van BAL vloeistof in de diagnostiek van longaandoeningen.³⁻⁵

Niet-infectieus	Infectieus
Sarcoïdose	(Ventilator-associated) pneumonie
Hypersensitivity pneumonitis ofwel extrinsieke allergische alveolitis	Pneumocystis pneumonie
Longfibrose	Mycobacteriële infectie
Bindweefselaandoeningen	<i>Aspergillus fumigatus</i> infectie
Langerhanscel histiocytose	Virale pneumonie
Maligniteiten	Toxoplasma pneumonie
Alveolaire bloeding	Legionella infectie
Alveolaire proteïnose	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> pneumonie
Eosinofiele pneumonie	<i>Chlamydia pneumoniae</i> pneumonie
Bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia	Cryptococcale infectie
Cryptogene organiserende pneumonie	Histoplasma infectie
Asbestose	Strongyloïdes infectie
Silicose	

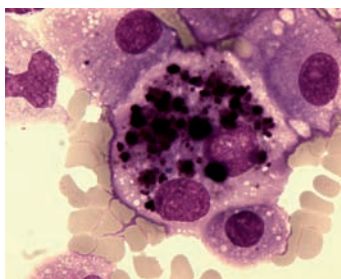
Tabel 2. Verschillende longaandoeningen met bijpassende differentiële celtelling.⁶

Geassocieerde aandoeningen	AM	Lym	PMN	Eos	PC	MC	RPII
Niet-infectieuze aandoeningen							
Sarcoïdose		↑	=	=/ ↑	-	=/ ↑	-
Extrinsieke allergische alveolitis	FAM	↑↑	↑	=/ ↑	+/-	↑↑	-
Drug-induced pneumonitis	FAM	↑↑	↑	↑	+/-	↑↑	-
Idiopathische pulmonaire fibrose		↑	↑ / ↑↑	↑	-	↑	+/-
COP/BOOP	FAM	↑	↑	↑	+/-	=/ ↑	
Eosinofiele pneumonie		↑	=	↑↑	+/-	=/ ↑	
Alveolaire proteïnose	FAM	↑	=	=	-	=	
Diffuse alveolaire bloeding		=/ ↑	↑	=/ ↑	-	=	+/-
ARDS		↑	↑↑	↑	-	=/ ↑	+/-
Hematologische maligniteiten		↑	↑	=/ ↑	-	=/ ↑	
Astma		=	=	↑	-	=	
Infectieuze aandoeningen							
Ventilator associated pneumonie		=	↑↑	=	-	=	+/-
<i>Pneumocystis jiroveci</i> pneumonie		=/ ↑	↑	=/ ↑	+/-	=	+/-
Virale pneumonie		=	↑↑	=	-	=	+/-
Aspiratie pneumonie	FAM	=	↑↑	=	-	=	+/-

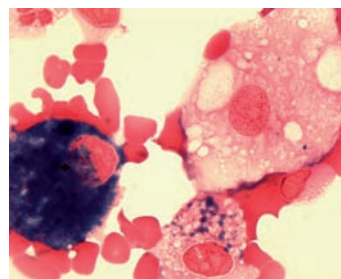
AM: alveolaire macrofagen, Lym: lymfocyten, PMN: polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten, Eos: eosinofielen, PC: plasma cellen, MC: basofielen (mestcellen), RPII: reactieve pneumocyten type II, FAM: schuimmacrofagen, COP: cryptogene organiserende pneumonie, BOOP: bronchiolitis obliterans with organising pneumonia. ARDS: acute respiratory distress syndrome



Figuur 1. MGG kleuring waarbij in het midden een eosinofiel te zien is, duidelijk herkenbaar aan de grote oranje granulae die zich in het cytoplasma bevinden, omringt door drie polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten. Rechts onder bevindt zich een alveolaire macrofaag. Vergroting: 1000×.



Figuur 2. In het midden is een alveolaire macrofaag gelegen waarin duidelijk gefagocyteerd materiaal is te zien. De aard van het materiaal is met behulp van deze kleuring niet te achterhalen. MGG kleuring, vergroting: 1000×.



Figuur 3. Fe-kleuring waarbij links onder een macrofaag met een positieve Fe-kleuring te zien is (herkenbaar aan de blauwe kleur). Rechts boven is een negatieve macrofaag te zien (rose). Door middel van de Fe-kleuring wordt hemosiderine dat zich in de macrofaag bevindt blauw gekleurd, vergroting 1000×.

Polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten

De polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten (PMNs, figuur 1 en 4) hebben een gemiddelde diameter van 12 tot 15 μm . Hun kern is onregelmatig van vorm en bestaat uit twee tot vijf lobben (gemiddeld 3). Ze hebben lichtroze gekleurd cytoplasma waarin talrijke roze korrels te zien zijn. Pycnotische segmentkernigen zijn PMNs die kleiner van formaat zijn, met slechts één, compacte, donker gekleurde celkern. Het zijn gedegeneerde cellen die worden gezien bij langdurende inflammatie.

Eosinofiële granulocyten

Eosinofiële granulocyten (Eos, figuur 1 en 4) hebben dezelfde diameter als de PMNs, echter hun kern bestaat meestal uit twee, ronde, lobben. Het cytoplasma is kleurloos en gevuld met grove oranjekleurige korrels. Veel Eos in een BAL kan een indicatie zijn voor astma, een drug-induceerd pneumonitis, eosinofiële pneumonie (>25% Eos), idiopathische longfibrose of pneumocystis pneumonie.

Basofielen

Basofielen, ook wel mestcellen (MC, figuur 5) genoemd, zijn grote cellen met in het cytoplasma blauwe tot paarse rode korrels die de kern geheel bedekken. Ze worden zelden aangetroffen in de BAL-vloeistof, maar kunnen wijzen op onder andere astma of bronchiolitis obliterans.

Bronchiale epitheelcellen

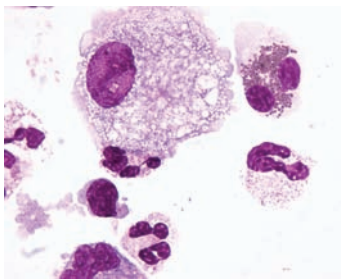
De aanwezigheid van deze cellen geeft een indicatie van contaminatie vanuit de bronchus. Ze zijn onder te verdelen in:

Trilhaarepitheelcellen (figuur 6)

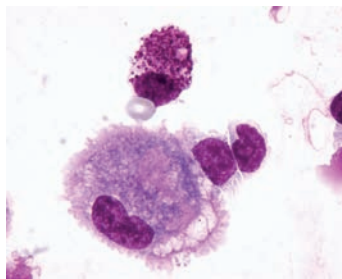
Dit zijn opvallende cilindervormige cellen met een kern die basaal ligt. De kern heeft een losmazige structuur en is rood gekleurd. Aan de bovenzijde van de cel zijn zogenaamde trilhaartjes aanwezig, losgeraakte haartjes kunnen soms worden verward met fijne, gegolfde, Gram-negatieve staaftjes.

Gobletcellen

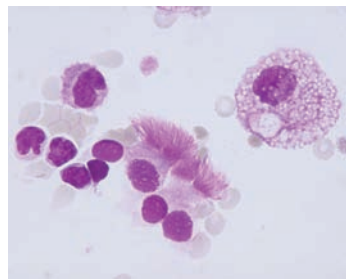
Deze cellen worden ook wel slijmbekercellen genoemd, zij produceren mucus. Ze worden niet vaak opgemerkt in een MGG-gekleurd preparaat. Het zijn lichte, lange cellen met een basale kern.



Figuur 4. MGG kleuring waarbij bovenaan in de figuur een schuimmacrofaag aanwezig is, herkenbaar als een grote cel met een enkele kern en cytoplasma waarin een grote hoeveelheid vacuolen aanwezig zijn. Bovendien is in de rechter bovenhoek een eosinofiel te zien, zijn er drie polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten aanwezig vlak onder de schuimmacrofaag en bevindt zich links onder de schuimmacrofaag nog een rijpe lymfocyt, vergroting 1000 \times .



Figuur 5. Bovenin de figuur is een basofiel te zien, duidelijk herkenbaar aan de paarse korreling in het cytoplasma, de korreling bedekt zelfs de celkern. Verder zijn in deze figuur een tweetal lymfocyten te zien (rechts) en een alveolaire macrofaag (links) MGG kleuring, vergroting 1000 \times .



Figuur 6. In het midden van deze figuur zijn een drietal trilhaarepitheel cellen te zien, herkenbaar aan de langwerpige vorm met een basale kern en aan de bovenzijde een grote hoeveelheid trilbaren. In de rechter bovenhoek bevindt zich een schuimmacrofaag, links in de figuur zijn vijf lymfocyten te zien. MGG kleuring, vergroting 1000 \times .

Plaveiselepitheelcellen

Aanwezigheid van deze cellen in de BAL-vloeistof wijst op contaminatie vanuit de mond/keelholte. Het zijn grote, platte, hoekige cellen met een donker gekleurde, relatief kleine kern. Ze zijn vaak bedekt met grote hoeveelheden bacteriën en kunnen derhalve de specificiteit van de kwantitatieve kweek nadelig beïnvloeden.

Reactieve 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 BAL-vloeistof, of kunnen ze niet worden onderscheiden van macrofagen. Echter in geval van ernstige longschade kunnen ze als reactieve pneumocyten type II (RPII, figuur 7) in de BAL teruggevonden worden. RPII cellen zijn grote cellen die zelfs bij kleine vergroting goed opvallen. Ze hebben een kleine, donkergekleurde kern die vaak aan de zijkant van de cel ligt. Verder is het cytoplasma donkergekleurd en bevat het grote vacuolen. Meestal liggen ze in groepjes bij elkaar. Ze kunnen verward worden met groepjes maligne cellen. De aanwezigheid van RPII is een specifieke indicatie voor ernstige longschade en kan voor-

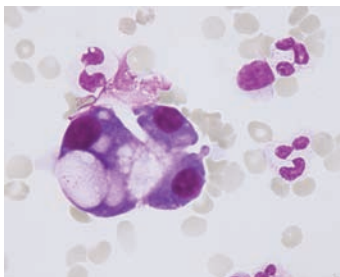
komen bij patiënten met onder andere acute respiratory distress syndrome (ARDS), pneumocysten pneumonie veroorzaakt door *P. jiroveci*, ventilator-associated pneumonie (VAP) en alveolaire bloeding.¹

Intracellulaire micro-organismen (Infected cells)

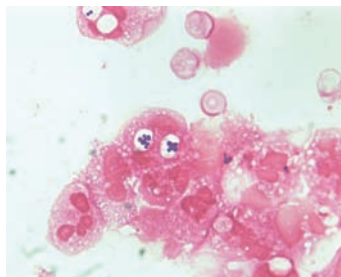
Infected cells of intracellulaire organismen (ICO, figuur 8), zijn cellen die micro-organismen gefagocyteerd hebben. Over het algemeen betreft dit PMNs, echter in een klein aantal van de gevallen zijn ook de AM hierbij betrokken. Bij het gebruik van een MGG kleuring kan de aanwezigheid van de ICOs goed waargenomen worden, bovendien kan het percentage ICO gelijktijdig met de differentiële celtelling uitgevoerd worden. De aanwezigheid van $\geq 2\%$ ICO per 500 getelde cellen in de MGG kleuring wijst bij een beademde patiënt op de diagnose VAP.²

Plasmacellen

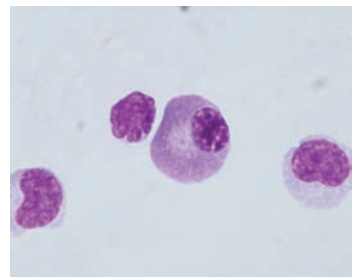
Plasmacellen (PC, figuur 9) zijn cellen met een doorsnede van 8 tot 20 μm , ze lijken op lymfocyten en hebben een ronde tot ovale kern die excentrisch gelegen is. Het cytoplasma is intens blauw met een tegen de kern gelegen



Figuur 7. Centraal in deze figuur is een reactieve pneumocyt type II. Dit zijn grote cellen die vaak in groepjes bij elkaar liggen, donker aankleuren in de MGG kleuring en een kern bevatten die aan de zijkant ligt. Bovendien zijn er vaak grote vacuolen aanwezig in het cytoplasma. MGG kleuring, vergroting 1000 \times .



Figuur 8. Centraal in deze figuur is een polymorfonucleaire neutrofiële granulocyt te zien die twee groepjes Grampositieve kokken in tros heeft gefagocyteerd. De bacteriën zijn zichtbaar in een vacuole in het cytoplasma van de polymorfonucleaire neutrofiële granulocyt. Gram kleuring, vergroting 1000 \times .



Figuur 9. Centraal in deze figuur is een plasmacel te zien, direct naast deze plasmacel bevindt zich een lymfocyt. Verder zijn nog twee geactiveerde lymfocyten te zien. MGG kleuring, vergroting 1000 \times .

Casus 1

Een 62 jarige man ligt na een trauma op de Intensive Care Unit en wordt sinds > 3 dagen beademd. Hij gebruikt geen immunosuppressieve therapie of antibiotica. De IC-arts denkt op basis van de thorax-foto aan een beademingspneumonie en vraagt een BAL aan. De betreffende BAL heeft een opbrengst van 80 ml met een troebel aspect. De totale cel telling levert 1.580.000 cellen/ml op. De differentieële cel telling op 500 cellen laat het volgende zien: 2,4 % alveolaire macrofagen (AM), 1,2 % lymfocyten (Lym), 94,2% polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten (PMNs) en 0,2% eosinofielen (Eos). Er worden enkele plaveiselepitheelcellen en trilhaarepitheelcellen gezien. Het percentage ICO is 0%. Verder worden en reactieve pneumocyten type II (RPII) cellen gezien. In de Gramkleuring worden Gram positieve kokken in strepto 0-1 per gezichtsveld gezien en de kweek levert 10^3 KVE/ml keelflora op. In eerste instantie lijkt de hoge totale cel telling en het hoge percentage PMNs te duiden op een pneumonie. Echter er worden geen intracellulaire bacteriën gezien en de kwantitatieve kweekuitslag is ook beneden het afkappunt (10^4 KVE/ml). De aanwezigheid van RPII cellen duidt op een ernstige longschade. De uiteindelijke diagnose bij deze patiënt was Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Bij dit ziektebeeld wordt in de BAL vloeistof, net als bij een pneumonie, een hoog totaal cel-aantal en een hoog percentage PMNs gezien (zie ook figuur 4).

heldere zone, soms wordt richting de celrand een oranje verkleuring van het cytoplasma gezien. Plasmacellen worden onder andere gezien bij patiënten met een infectie met *P. jiroveci*, extrinsieke allergische alveolitis en maligne lymfomen.

Micro-organismen

Naast de al eerder besproken ICOs die wijzen op een (bacteriële) pneumonie, zijn er nog een aantal micro-organismen die door middel van BAL-vloeistof aangetoond kunnen worden. Enkele voorbeelden hiervan zijn: Mycobacteriën (tuberculose en atypische), *P. jiroveci* (figuur 10), *Cryptococcus neoformans* (figuur 11) en *Aspergillus fumigatus* (figuur 12).

Additionele diagnoses

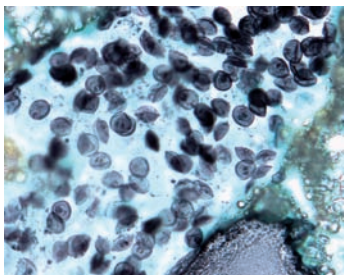
Bij een aantal ziektebeelden kan “vreemdlichaammateriaal” in de BAL-vloeistof aangetoond worden. Enkele voorbeelden zijn: asbest (figuur 13) en dubbelbrekend materiaal (waaronder glasvezels, keramische materialen, steenwol).

De diagnostische waarde van BAL-vloeistof

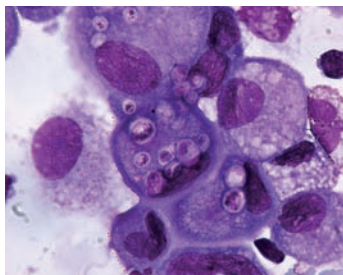
In het Maastricht Universitair Medisch Centrum heeft de diagnostiek van BAL-vloeistof een belangrijke rol bij het onderzoek naar longaandoeningen. Het onderzoek wordt toegepast bij zowel infectieuze als niet-infectieuze aandoeningen. Bij het stellen van de diagnose VAP bijvoorbeeld heeft diagnostiek van BAL-vloeistof echt een sleutelpositie, binnen twee uur kan de diagnose, met een grote mate van zekerheid, gesteld worden aan de hand van microscopie (percentage ICO, met als afkappunt 2%). Na 48 uur volgt de definitieve bevestiging aan de hand van de kwantitatieve kweek. Ook bij de diagnostiek van andere infectieuze aandoeningen kan analyse van BAL-vloeistof een grote rol spelen. Hierbij kan gedacht worden aan infecties met *M. tuberculosis*, *P. jiroveci* (figuur 10), *Aspergillus fumigatus* en *Cryptococcus neoformans*. Bovendien kan de analyse van BAL-vloeistof ook helpen de differentieële diagnose bij niet-infectieuze aandoeningen, waaronder ARDS (casus 1) en alveolaire bloeding (casus 2), te verkleinen (tabel 1 en tabel 2). Hierbij is het van groot belang om alle gegevens van zowel BAL-vloeistof analyse als de klinische gegevens van de patiënt, longfunctie-onderzoek, radiologie en laboratoriumonderzoek te combineren om zo tot een definitieve diagnose te komen.

Casus 2

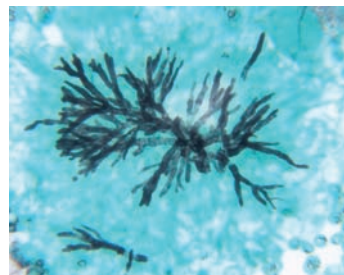
Een 37 jarige man is na een thorax trauma opgenomen op de Intensive Care Unit. Hij wordt inmiddels meer dan 3 dagen beademd. Hij gebruikt geen immunosuppressieve therapie of antibiotica. Patiënt rookt niet. De IC-arts denkt bij deze patiënt aan een beademingspneumonie. Bij deze patiënt wordt dan ook op deze indicatie een BAL verricht. De opbrengst van de BAL is 80 ml vloeistof die bij iedere fractie toenemend bloederig wordt. De totale cel telling levert 360.000 cellen/ml op. In de differentiële cel telling op 500 cellen worden 88,0 % AM, 7,0 % Lym, 4,0 % PMNs en 1,0 % Eos gezien. Het totale aantal intracellulaire bacteriën bedraagt 0,2%. Verder zijn er in de BAL-vloeistof veel puinbeladen macrofagen (figuur 2) aanwezig. In de Gram-kleuring worden Gram-positieve kokken in strepto 0-1 per gezichtsveld gezien en de kweek levert 10^3 KVE/ml keelflora op. Een aanvullende Fe-kleuring toont 56% van de macrofagen positief met een sterke intensiteit (afkappunt; 20%; figuur 3). Zowel de totale cel telling als de differentiële cel telling leveren geen afwijkende resultaten op. Echter het aspect van de BAL en de aanwezigheid van puinbeladen macrofagen bij een niet roker, geeft een indicatie voor de diagnose longbloeding. De diagnose wordt uiteindelijk bevestigd door de positieve ijzerkleuring.



Figuur 10. Deze figuur toont de aanwezigheid van cysten van *Pneumocystis jirovecii*. Deze schimmel is te herkennen aan de ovale tot ronde vorm en de typische haakvormige wandverdichtingen die op sommige cysten zichtbaar zijn. Grocott-kleuring, vergroting 1000x.

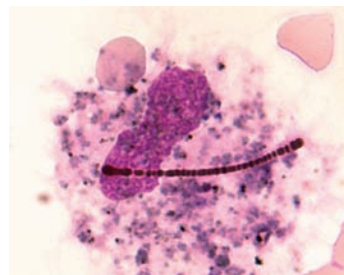


Figuur 11. In deze figuur zijn een aantal onregelmatige structuren met een dikke wand zichtbaar die zich in de macrofagen bevinden. In de Grocott-kleuring van deze BAL-vloeistof kleurde de betreffende structuren zwart aan. De dikke wand is een typisch kenmerk van de schimmel die op dit plaatje te zien is. Het betreft hier *Cryptococcus neoformans*. MGG kleuring, vergroting 1000x.



Figuur 12. Deze figuur toont een bundel gesegmenteerde draden van een schimmel. De schimmeldraden vertakken zich onder een hoek van 45°. Uit de kweek van deze BAL-vloeistof groeide *Aspergillus fumigatus*. Grocott-kleuring, vergroting 400x.

De bijgevoegde casuïstiek toont een aantal voorbeelden van de toegevoegde waarde van (met name de differentiële cel telling) een BAL. Extra informatie over cellen die voorkomen in BAL vloeistof is terug te vinden op de website: <http://www.wasogbal2011.nl/bal.htm>.



Figuur 13. Deze figuur toont een alveolaire macrofaag die een asbestvezel gefagocyteerd heeft. MGG kleuring, vergroting 1000x.

Voor de praktijk

In de praktijk blijkt de BAL-vloeistof van onschatbare waarde. Een BAL is een, voor de patiënt, relatief weinig belastende techniek die informatie op kan leveren over de immunestatus van de long en het wel of niet aanwezig zijn van infecties. Het celprofiel van een BAL kan een aanwijzing leveren voor een bepaald ziektebeeld of het zorgt juist voor uitsluiting hiervan. Een voorbeeld is het uitsluiten van een bacteriële infectie door middel van het microscopisch tellen van het percentage intracellulaire bacteriën. Voor een juiste interpretatie is daarom kennis omtrent de betekenis van de aanwezigheid of juist afwezigheid van bepaalde celtypen en de verdeling daarvan van groot belang. Ook aanvullende kleuringen kunnen behulpzaam zijn bij het uiteindelijk vaststellen van de onderliggende longaandoening, bijvoorbeeld een ijzerkleuring om de aanwezigheid van bloedbestanddelen aan te tonen of uit te sluiten.

Referenties

1. Linssen KC, et al. Reactive type II pneumocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Acta Cytol* 2004; 48: 497-504.
2. Allaouchiche B. et al. Early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. Is it possible to define a cutoff value of infected cells in BAL fluid? *Chest* 1996. 110: 1558-65.
3. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 250-63.
4. Reynolds HY. Use of bronchoalveolar lavage in humans--past necessity and future imperative. *Lung* 2000. 178: 271-93.
5. Park DR. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005; 50: 742-63; discussion 763-5.
6. Drent M, et al. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 486-95.