

59 Il lavaggio broncoalveolare (BAL) in età pediatrica

Oliviero Sacco

-
- INTRODUZIONE
 - ASPETTI TECNICI
 - La sedazione
 - Sede di esecuzione del BAL
 - Instillazione e recupero della soluzione fisiologica impiegata per il BAL
 - Esecuzione del BAL nei pazienti ventilati
 - COMPLICAZIONI DEL BAL
 - IL TRATTAMENTO DEL *BRONCOALVEOLAR LAVAGE FLUID* (BALF)
 - Filtrazione e centrifugazione
 - Analisi della componente cellulare
 - La normale cellularità del BAL nei bambini
 - L'importanza della conta differenziale
 - Ricerche particolari sulle cellule del BAL
 - Ricerca dei siderofagi
 - Ricerca dei lipofagi
 - Ricerca e diagnosi della proteinosi alveolare
 - Analisi microbiologica del BALF
 - INDICAZIONI CLINICHE CONCLUSIVE
 - BAL TERAPEUTICO
-

■ INTRODUZIONE

Il lavaggio broncoalveolare o BAL, permettendo di ottenere le cellule ed i soluti presenti sulla superficie epiteliale del tratto respiratorio distale, si è dimostrato una metodica di ricerca essenziale per lo studio dei meccanismi eziopatogenetici delle malattie del polmone profondo, come ad esempio lo studio delle interstiziopatie, su cui esiste una vastissima letteratura di dati ottenuti con il BAL. Oltre a questo aspetto di metodica di ricerca, il BAL rappresenta però anche una procedura diagnostica insostituibile nella pratica clinica quotidiana.

Tralasciando l'uso del BAL nella ricerca clinica, si vuole qui trattare dell'impiego del BAL come strumento diagnostico nella pneumologia pediatrica: l'esecuzione di questa procedura rappresenta, infatti, di per sé una delle maggiori indicazioni per eseguire una broncoscopia in età pediatrica. Alcuni anni or sono, e precisamente nel 1996, l'*European Respiratory Society*, verificando che questa metodica veniva sempre più usata anche in età pediatrica senza che si fossero stabilite delle chiare linee guida, approvò la costituzione di una *task force* sul BAL in età pediatrica, con lo scopo di porre appunto delle linee guida su come eseguire tecnicamente la metodica, definire le indicazioni cliniche ad eseguire l'esame ed infine l'interpretazione dei suoi dati [1].

Partendo dal lavoro dell'ERS *task force*, pubblicato poi nel 2000, verranno sottolineati principalmente gli aspetti pratici e le eventuali differenze di esecuzione e di interpretazione con la stessa metodica eseguita nell'età adulta, possibilmente anche aggiungendo ulteriori dati clinici raccolti susseguentemente.

■ ASPETTI TECNICI

La sedazione

La maggior differenza nell'esecuzione del BAL in età pediatrica, rispetto all'adulto, riguarda non tanto la metodica in sé, quanto la broncoscopia nel suo complesso che, almeno in Italia, nella maggior parte dei centri ove viene praticata, viene eseguita quasi sempre in sala operatoria, con l'assistenza di un anestesista che esegue sul paziente un'anestesia generale, anche se il paziente non viene intubato e permane in respirazione spontanea. Generalmente il paziente pediatrico riesce ad essere collaborante solo alla fine dell'età pediatrica, ovvero dopo i 13-14 anni, anche se l'autocontrollo può essere raggiunto in età diverse da paziente a paziente. Qualora il paziente adolescente sia collaborante, la metodica di esecuzione dell'endoscopia non differisce da quella seguita nell'adulto, e non verrà trattata in questa sede.

Ci preme sottolineare che, ogni qualvolta il paziente non è collaborante, quindi nella quasi totalità dei casi nei pazienti pediatrici, è assolutamente raccomandabile eseguire la metodica in presenza di un anestesista anche se il paziente si trova in buone condizioni generali, per essere pronti a far fronte alle sia pur rara insorgenza di complicazioni, quali una (transitoria) insufficienza respiratoria.

È poi essenziale, qualora dovessero insorgere problematiche medico-legali, poter dimostrare che si erano prese tutte le possibili precauzioni per mettere in sicurezza il paziente. Inoltre frequentemente, nel caso di infiltrati o malattie interstiziali diffuse con iniziale insufficienza respiratoria (soprattutto se solo parzialmente correggibile con l'ossigeno), l'indicazione ad eseguire il BAL coincide con la controindicazione a sottoporre il paziente alla metodica. Questi casi devono essere chiaramente considerati come rapporto costi-benefici, ed il paziente valutato in maniera congiunta dallo pneumologo pediatra e dall'anestesista che lo assisterà nell'esecuzione della metodica. Ultima considerazione pratica è la tempistica: qualora le condizioni del paziente mostrino di peggiorare di giorno in giorno, un esame broncoscopico con BAL, fattibile al momento, può divenire molto problematico o impossibile da eseguire nei giorni a venire.

I farmaci più usati per l'anestesia sono generalmente la meperidina ed il midazolam, anche se ogni anestesista può avere personalmente delle preferenze per un farmaco più che per un altro [2].

Il paziente, ventilato con ossigeno attraverso un'usuale maschera per anestesia e con accesso venoso sempre disponibile, è monitorato attraverso un pulsossimetro cutaneo e cardiomonitor. Sopra la maschera da anestesia viene posizionato un tubo a "T", che assicura al contempo sia il passaggio dell'endoscopio attraverso il naso del paziente, sia la somministrazione di ossigeno in maschera. Prima di iniziare la broncoscopia, anche se la metodica viene eseguita in anestesia generale, è consigliabile instillare nelle cavità nasali un anestetico locale come la lidocaina all'1%-2%, ed altro anestetico verrà poi instillato attraverso il broncoscopio sulle corde vocali e sulla carena tracheale. La dose totale di lidocaina non deve comunque eccedere i 5 mg/Kg peso corporeo, per cui una fiala di lidocaina al 2% da 5 ml può essere usata tutta solo in un paziente di 18-20 Kg: la lidocaina viene assorbita rapidamente dalle mucose e compare nel sangue con effetti sistemici. Qualora si usi poi anche il preparato spray sulla glottide, si deve considerare che un solo spruzzo contiene già 10 mg di anestetico [3].

Poiché il broncoscopio viene generalmente introdotto per via nasale, è anche utile l'impiego di un vasocostrittore come la fenilefrina, per ridurre la presenza di un'eventuale edema/infiammazione della mucosa nasale, così da rendere le coane del bambino più pervie al passaggio dello strumento. L'uso di un vasocostrittore, nella nostra esperienza, diminuisce anche l'incidenza di epistassi provocata dal passaggio del broncoscopio attraverso le coane.

L'uso dell'atropina per diminuire le secrezioni bronchiali e contrastare la bradicardia per

eventuale riflesso vagale non è così diffusamente impiegato in campo pediatrico come nell'adulto. Essendo un farmaco di premedicazione, la sua somministrazione sc almeno 15-20 minuti prima della broncoscopia, come spesso si usa negli adulti, generalmente causa il pianto del bambino, lo agita e non ne favorisce il suo arrivo in sala operatoria rilassato e sereno, per cui molto spesso si evita il suo impiego. Se usata, se ne consiglia la somministrazione ev lenta (10-20 mg/Kg); qualora il paziente presenti una frequenza cardiaca superiore ai 140/150, il suo uso deve essere ulteriormente ponderato [4].

Sede di esecuzione del BAL

Il BAL viene generalmente eseguito con l'impiego di un fibro- o videobroncoscopio pediatrico con canale operatore, il cui diametro esterno è generalmente di 3,5 mm nei bambini inferiori a 9-10 anni (peso corporeo 30-35 Kg) e con strumenti con diametro esterno di 4,6-4,9 mm nei pazienti più grandi.

La sede di esecuzione del BAL è generalmente nel bronco segmentario che afferisce alla zona di parenchima sede della patologia in studio se il processo è focalizzato mentre, nel caso di patologie generalizzate, la sede del BAL è preferenzialmente nel lobo medio o nella lingua. Questi distretti, speculari tra loro, sono le sedi preferite per l'esecuzione della metodica perché, quando il paziente giace supino, la loro posizione è tale da favorire il recupero del liquido instillato. Non diversamente che nell'adulto il broncoscopio deve essere fatto procedere nel bronco prescelto fino a far sì che la punta dello strumento si incunei nel bronco, occludendone il lume ed impedendo così che il liquido instillato refluisca verso le vie aeree centrali invece di arrivare al parenchima.

Nei bambini di età inferiore agli 1-2 anni e con peso corporeo <10-15 Kg, qualora non si riesca ad incuneare bene il broncoscopio nel bronco lobare medio o linguare per le loro piccole dimensioni, come seconda scelta elettiva si può eseguire il BAL nella piramide basale del lobo inferiore destro o sinistro, di facile accesso.

Si ricorda che, nel caso in cui vi siano le indicazioni ad eseguire il BAL in due segmenti polmonari, uno sede di malattia, uno di normale aspetto radiologico, è consigliabile eseguire la metodica prima nella zona di parenchima sano, così che il canale operativo dello strumento non venga contaminato, come avverrebbe invece se il BAL fosse prima eseguito nella zona affetta. Queste considerazioni sono particolarmente importanti nel caso di infiltrati polmonari di sospetta natura infettiva.

Instillazione e recupero della soluzione fisiologica impiegata per il BAL

Nell'adulto la metodica più comunemente accettata per eseguire il BAL è quella di instillare cinque aliquote di 20 ml ciascuna di soluzione fisiologica sterile (preferibilmente a temperatura corporea). Così facendo ed aspirando dopo ogni aliquota, la prima frazione recuperata è più rappresentativa della citologia bronchiale: più ricca di neutrofili e meno di linfociti rispetto alle aliquote seguenti, che a loro volta sono più rappresentative della citologia e delle varie componenti non-cellulari di origine alveolare. Nell'adulto si tende quindi a raccogliere separatamente la prima aliquota instillata, mentre le seguenti verranno aspirate nello stesso contenitore [5].

In età pediatrica la quantità di liquido instillato non è chiaramente fissa, ma dipende dal peso corporeo del paziente: da 1 a 3 ml di soluzione fisiologica/Kg, scegliendo i volumi più piccoli quanto più le condizioni del paziente sono critiche. Anche se non si è ancora raggiunta

un'universale standardizzazione della metodica, attualmente è sempre più diffusa l'abitudine di instillare tre aliquote uguali, ognuna del volume di 1 ml/Kg peso corporeo [6].

Si deve però anche considerare che, per ottenere un sufficiente recupero da ogni aliquota, il volume della stessa non dovrebbe comunque essere minore di 5 ml, considerando che il recupero mediamente è del 40%-50%. Ne consegue che, fino ad un peso corporeo di 4-5 Kg, non è generalmente fattibile raccogliere separatamente le diverse aliquote: instillando 10-15 ml di fisiologica in totale, se il recupero è di 6-7 ml, una suddivisione di questo in una prima aliquota bronchiale ed una seconda alveolare può divenire problematica proprio per l'esiguità del volume del liquido recuperato.

La metodica di suzione impiega generalmente un aspiratore che genera una pressione negativa non troppo elevata (25-100 mmHg), in quanto le vie aeree dei bambini sono più facilmente collassabili rispetto a quelle degli adulti, l'aspiratore viene collegato ad una provetta che funge da trappola per il liquido recuperato.

Esecuzione del BAL nei pazienti ventilati

Quando il paziente è in UTI, intubato e ventilato, si usa un connettore a forma di "Y" per permettere il proseguimento della ventilazione durante l'introduzione del broncoscopio nel tubo tracheale. Un broncoscopio pediatrico standard, del diametro esterno di 3,4-3,6 mm, può passare attraverso in tubo tracheale col diametro interno di almeno 4,5-5,0 mm e permettere al tempo stesso una minima ventilazione.

I tubi tracheali con diametro <4,5 mm possono essere facilmente incannulati solo dai più piccoli broncoscopi neonatali con il diametro esterno di solo 2,2 mm, ma questi strumenti sono privi di canale operativo. In questi pazienti, intubati con un piccolo tubo tracheale, il BAL può essere comunque eseguito usando un semplice catetere (o un catetere a palloncino, misura 4-8 ranch), che andrà spinto in periferia fino al suo incuneamento in un bronco subsegmentario, possibilmente facendolo passare attraverso un diaframma, così che possa essere mantenuta la pressione positiva della ventilazione [7].

Con tale metodica il punto di esecuzione del BAL non può essere determinato con la stessa accuratezza che con il broncoscopio, ma almeno si riesce a guidarne l'introduzione nel bronco principale di scelta: piegando, infatti, la testa del paziente verso sinistra al momento dell'introduzione del catetere, lo stesso verrà indirizzato preferenzialmente verso il bronco principale di destra, e viceversa. Con la sola eccezione della mancanza di accuratezza del punto di esecuzione della metodica (a parte la scelta del lato), il BAL eseguito "alla cieca" con catetere fornisce dati equivalenti a quello eseguito con broncoscopio, almeno nei pazienti con problematiche polmonari diffuse, come le bronchioliti da VRS [8].

L'impiego del BAL nei pazienti ventilati è un esempio della sua grande utilità clinica per distinguere le vere polmoniti del paziente ventilato che non rispondono all'iniziale trattamento antibiotico, da tutte le altre condizioni che inducono infiltrati polmonari non su base infettiva: le emorragie polmonari, l'ARDS, le polmoniti eosinofile, l'edema su base cardiogena, la tossicità da farmaci, per non citarne che le principali [9].

■ COMPLICAZIONI DEL BAL

Il paziente, sottoposto a BAL nel corso della mattinata, può sviluppare una singola puntata iperipretica alcune ore dopo, generalmente nel pomeriggio, a risoluzione spontanea ed eziologia in-

certa. Questa complicanza più banale e comune del BAL ha una frequenza che, nella nostra casistica, avviene una volta ogni 5-6 procedure. Solo molto raramente la febbre persiste e può essere considerata una complicanza vera, effettivamente correlata a diffusione di un processo infettivo.

L'esecuzione del BAL, prolungando di solo 2-3 minuti l'endoscopia, di per sé non aumenta che marginalmente il rischio di ipercapnia ed ipossia, a patto che il paziente venga ventilato correttamente e che il broncoscopio venga fatto passare attraverso il tubo a "T" mentre il paziente è ventilato in maschera, come sovraesposto.

Anche se naturalmente ogni tipo di alterazione della coagulazione può di per sé aumentare il rischio di sviluppare un'emorragia mucosale, queste sono molto rare, se si applica una gentile suzione nel recuperare il liquido instillato. Il BAL è stato eseguito anche in bambini con un'importante piastrinopenia (20000 PLT/mm^3), senza che si sviluppasse complicazioni emorragiche. Queste in realtà, più che a livello del punto di esecuzione del BAL, possono avvenire più frequentemente a livello della coana ove passa lo strumento [10].

■ IL TRATTAMENTO DEL BRONCOALVEOLAR LAVAGE FLUID (BALF)

Filtrazione e centrifugazione

Il procedimento per trattare e studiare il BALF proveniente da un paziente pediatrico non è diverso da quello in uso negli adulti.

La provetta di raccolta del BALF deve essere subito raffreddata a 4°C in acqua/ghiaccio ed inviata al laboratorio appena possibile. Se esiste una prima aliquota del BALF raccolta separatamente, questa viene generalmente impiegata per studi colturali così come è stata ottenuta dal paziente, per non perdere carica batterica o alterarne la composizione. Se è indicata (raramente) la ricerca di anaerobi, il liquido deve essere inoculato nell'apposito medium di coltura appena possibile.

Le restanti aliquote del BALF vengono poi filtrate attraverso una garza sterile per allontanare il muco quindi, per lo studio della quota cellulare, il liquido viene centrifugato a 250-500 g per 8-10 minuti. Il sovrantante viene quindi aspirato e generalmente conservato a -20°C per eventuali ulteriori studi di proteomica, al momento più di interesse di ricerca che clinico [11].

Analisi della componente cellulare

Il pellet cellulare ottenuto con la centrifugazione è risospeso in 0,5-1 ml di medium per coltura cellulare, e la sospensione cellulare così ottenuta viene usata per l'allestimento di citopreparati, ottenuti generalmente con l'impiego di una citocentrifuga. Se questa non è disponibile, si possono allestire strisci su vetrini, non diversamente di quanto in uso in ematologia. In ogni caso è utile allestire diversi vetrini, anche se solo alcuni verranno usati al momento.

Le colorazioni più usate per la citologia sono il May-Grunwald Giemsa ed il Diff-Quick (Merz & Dade A.G., Dudigen, Germany); a quest'ultima colorazione va spesso la preferenza dei laboratori di pneumologia, in quanto tutto il ciclo di colorazione si completa in circa 10 minuti. Il limite del Diff-Quick, come riferito da diversi anatomopatologi, è quello di non dare la miglior definizione della cromatina nucleare, particolare importante per l'identificazione di eventuali cellule neoplastiche. L'indicazione alla ricerca di cellule tumorali, molto comune nell'età adulta, nei pazienti pediatrici è comunque per fortuna molto più rara.

Per eseguire la conta differenziale è necessario identificare almeno 300-440 cellule, quindi eseguire le percentuali. Le eventuali cellule epiteliali devono concorrere a determinare la cellula-

rità totale del BALF, ma le stesse sono generalmente escluse dal calcolo delle percentuali della conta differenziale. Qualora si ottenga ripetutamente un'alta contaminazione da cellule epiteliali (>10%) nel BALF, si incorre con tutta probabilità in errori di esecuzione della metodica, di cui ricordiamo i più comuni. 1) La pressione di aspirazione è troppo elevata, con conseguente collasso delle pareti bronchiali (tanto più probabile fino ai 2-3 anni di età) e facilità di suzione della mucosa nel canale operativo dello strumento; il collabimento della parete bronchiale è comunque facilmente verificabile visivamente durante l'esecuzione della metodica. 2) Il broncoscopio non è bene incuneato nel bronco ed in asse con il lume bronchiale, ma la sua estremità punta contro le pareti bronchiali con conseguente difficoltà nel recupero del BALF, in cui appariranno anche eritrociti oltre che cellule epiteliali. 3) Lo strumento non viene tenuto fermo durante la metodica, ma va avanti e indietro lungo il lume bronchiale, con effetto "spazzola".

La normale cellularità del BAL nei bambini

Poiché non è etico eseguire il BAL in bambini sani solo a scopo di studio, i valori di "normalità" sono stati ottenuti durante endoscopie eseguite per indicazioni cliniche che venivano ritenute non correlabili con una patologia bronco-polmonare quali laringomalacia, stenosi delle vie aeree centrali, *follow-up* di inalazione pregressa di corpi estranei etc., o al momento dell'esecuzione di anestesia generale per interventi chirurgici non associabili a patologia respiratoria. In questo caso il BAL veniva eseguito per lo più senza l'uso di un broncoscopio, ma usando un catetere introdotto lungo il tubo tracheale ed incuneato alla cieca in un bronco subsegmentario. Tutti i pazienti presentavano normale radiografia polmonare, normale funzionalità respiratoria, assenza di segni clinici o laboratoristici di infezioni sistemiche e/o a carico delle alte o basse vie aeree.

Con queste limitazioni di relativa "normalità", la cellularità totale/ml di BALF è risultata variare di molto tra i diversi studi: da 10000 cellule/ml a 60000/ml, con variazioni che anche risentono dell'età dei pazienti, in quanto pazienti più piccoli tendono ad avere cellularità totale più elevata, non diversamente dai GB del sangue periferico [12-14].

Si consiglia, nei pazienti pediatrici, di mantenere come limite superiore di normalità le 400000 cell/ml di BALF, valore oltre il quale si può parlare effettivamente di aumento della cellularità totale o assoluta alveolare.

Queste considerazioni sui valori della cellularità totale sono chiaramente validi solo in presenza di un BAL eseguito in maniera corretta: quanto più elevata la quota di cellule epiteliali contaminanti (sia squamose, di derivazione orofaringea, sia cigliate della mucosa bronchiale), quanto meno sono valide queste considerazioni sulla cellularità totale. Se le cellule epiteliali sono >30%-40% di quelle recuperate, il BAL non è stato eseguito correttamente, e non si può più parlare di valori normali di riferimento della cellularità totale (Fig. 1).

La conta differenziale delle cellule presenti nei BALF ottenuti in età pediatrica può essere paragonata a quella riscontrata nei controlli adulti. Facendo la media tra i diversi studi pubblicati e dalla nostra esperienza, i valori "normali" di riferimento usati nel nostro laboratorio, possibilmente scartando la prima aliquota del BALF sono i seguenti:

- macrofagi: 85%-90%
- linfociti: 8%-10%
- neutrofili: 1%-4%
- eosinofili: 0%-0,2%

Riguardo al giudizio di una buona esecuzione del BAL, poiché la popolazione macrofagica è la preponderante, ed il macrofago è la vera cellula residente alveolare, solo la presenza di una

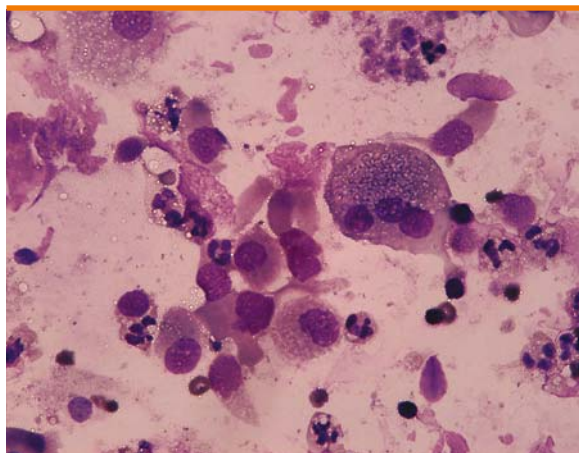


Fig. 1. BAL con intensa contaminazione di cellule cigliate della mucosa bronchiale in un caso in cui il recupero del liquido di lavaggio era stato scarso e l'aspirazione era perdurata più del dovuto per tentare di aumentare il recupero: BAL non eseguito correttamente

discreta quota di macrofagi (almeno 10%-20%) nelle aliquote di BALF susseguenti la prima è la prova che il liquido di lavaggio ha effettivamente raggiunto il parenchima polmonare.

L'importanza della conta differenziale

La conta differenziale è essenziale per rispondere al quesito che è alla base dell'indicazione per l'esecuzione del BAL: esiste alveolite, ovvero infiammazione del parenchima polmonare, e se la risposta è affermativa, di quale tipo? La distinzione fondamentale è tra:

- alveolite neutrofilica: polmoniti batteriche, bronchite cronica, vari tipi di fibrosi/interstiziopatie polmonari, inalazione ricorrente di materiale gastrico da eventi di reflusso gastroesofageo, asma;
- alveolite eosinofila: polmoniti eosinofili, asma, aspergillosi allergica broncopolmonare, sindrome di Churg-Strauss (estremamente rara nei bambini), reazioni a farmaci;
- alveolite linfocitaria: polmonite da ipersensibilità, tubercolosi, artrite reumatoide, polmonite interstiziale linfocitaria nell'AIDS, etc.).

Stabiliti i valori indicativi di normalità per neutrofili e linfociti, ogni aumento significativo rispetto a questi (indicativamente almeno il 50%) può deporre per la presenza di alveolite. In presenza di una vera alveolite, l'aumento di una quota cellulare dovrebbe poi causare anche l'aumento consequenziale della cellularità totale [15].

Qualora si sia in presenza di un'alveolite linfocitaria, per valutare quanto il processo sia attivo, oltre alla percentuale dei linfociti presenti, si può ricorrere alla determinazione delle sottopopolazioni o fenotipo linfocitario, identificando i markers di attivazione sulla superficie cellulare: rapporto tra CD4 e CD8, espressione di molecole di classe II HLA DR, recettore per IL-2, etc. È consigliabile che questo esame sia eseguito in contemporanea sui linfociti del BALF e su quelli ricavati dal sangue periferico: lo stato di attivazione linfocitaria d'organo (locale) può essere così paragonato allo stato di attivazione presente a livello ematico (sistemico). È razionale richiedere lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie solo qualora si sia in presenza di una vera linfocitosi (linfociti >10% nella conta differenziale). La prevalenza di cellule CD4+ si ha nella sarcoidosi e nel morbo di Crohn, mentre prevalgono i linfociti CD8+ nelle polmoniti da ipersensibilità, nell'istiocitosi X, nelle polmoniti da farmaci, nella BOOP [16].

Gli anticorpi monoclonali si usano anche nella diagnosi dell'istiocitosi polmonare, ove si ricercano le cellule CD1+: qualora la loro percentuale >5%, la diagnosi è molto probabile. Percentuali minori non sono invece ritenute diagnostiche, in quanto 2%-3% di cellule CD1+ possono essere presenti anche in pazienti normali [17].

Ricerche particolari sulle cellule del BAL

Ricerca dei siderofagi

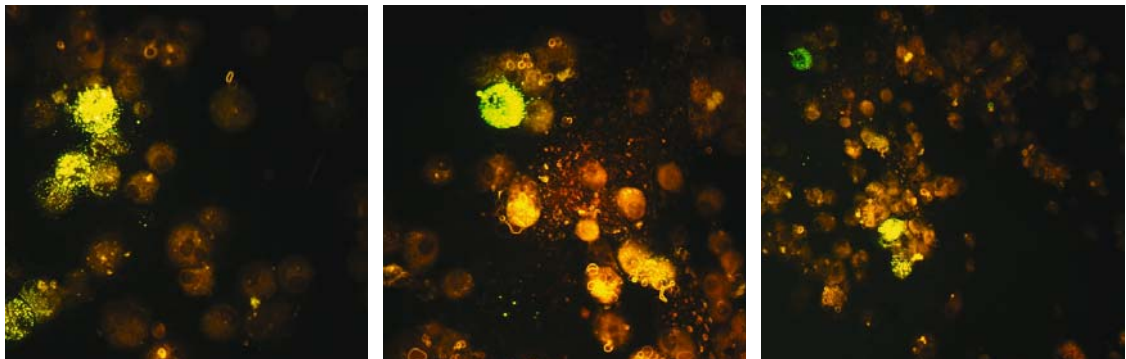
Il BAL è la metodica essenziale nella diagnostica delle emorragie alveolari, pregresse o in atto (nel bambino essenzialmente nell'emosiderosi polmonare idiopatica e nell'alveolite emorragica da chemioterapia oncologica, più raramente nelle vasculiti associate alle malattie del collagene). La diagnosi infatti si basa sulla ricerca del ferro nel citoplasma dei macrofagi alveolari che, con la colorazione di Mallory diviene evidente: si visualizzano i siderofagi, macrofagi che hanno fagocitato eritrociti giunti nell'alveolo. Se l'emorragia alveolare risale a settimane prima del BAL, si potranno apprezzare solo i depositi di emosiderina, se è un fatto recente (giorni), i GR fagocitati saranno ancora visibili all'interno dei macrofagi, in varie fasi di degradazione. Se l'emorragia è in atto, la prima aliquota del lavaggio (bronchiale) può non presentare colorazione ematica, che invece diventerà sempre più evidente nelle aliquote successive (alveolari), che assumeranno via via un aspetto più francamente ematico. Qualora si sospetti un'alveolite emorragica vi è pertanto la massima indicazione alla raccolta frazionata non solo della prima aliquota del BALF ma anche di ogni aliquota successiva [18].

Si ricorda qui incidentalmente che, il riscontro di GR nel BALF senza eritrofagocitosi in atto e senza una significativa quota di siderofagi è da considerare solo come contaminazione, avvenuta durante l'aspirazione del BALF.

Ricerca dei lipofagi

Analogamente alla colorazione di Mallory che rende evidenti gli accumuli di ferro nei macrofagi alveolari, così le colorazioni con il Nile Red o con il Red Oil visualizzano i vacuoli di grasso nel citoplasma dei macrofagi, che vengono così detti lipofagi (Fig. 2). Qualche raro lipofago si può riscontrare anche nel BALF di un soggetto normale, ma il loro numero può aumenta-

Fig. 2. Colorazioni con Nile Red di macrofagi alveolari, che presentano positività di vario grado come contenuto intracitoplasmatico di goccioline di grasso, così che il loro score varia da 0 (negatività al Nile Red) a score 4 (totale scomparsa di ogni dettaglio cellulare). I macrofagi alveolari positivi spiccano per presenza di goccioline al loro interno, di un colore giallo brillante



re considerevolmente in patologie molto diverse, che inducono tutte l'accumulo nel loro citoplasma di grassi di origine endogena o esogena. L'accumulo di lipidi di origine endogena può avvenire nelle bronchiectasie, fibrosi polmonari, polmoniti ostruttive, tumori polmonari: tutte condizioni che causano turbe nel metabolismo del surfactante, i cui prodotti di degradazione si possono così accumulare all'interno del citoplasma macrofagico. Nell'età pediatrica la condizione clinica che più frequentemente si associa ad un aumento dei lipofagi non è una di queste, bensì l'arrivo nell'alveolo di grassi esogeni, con l'inalazione cronica di materiale alimentare.

I macrofagi, che fagocitano le sostanze estranee giunte nell'alveolo, il cui accumulo potrebbe interferire con la funzionalità della membrana alveolo-capillare, nel caso dell'inalazione di materiale alimentare riescono a catabolizzare proteine e glucidi ma non i grassi, che così si accumulano con il tempo nel loro citoplasma. Questo può avvenire: 1) per turbe della deglutizione, soprattutto nei pazienti con seri problemi neurologici e conseguente incoordinazione motoria, oppure 2) nella malattia da reflusso gastro-esofageo. In quest'ultimo caso il materiale gastrico può risalire l'esofago fino a passare lo sfintere esofageo superiore e bagnare il laringe e, qualora i riflessi tussigeni non siano sufficientemente validi, causare inalazione di materiale alimentare di origine gastrica. Queste inalazioni, molto piccole di volume ma ricorrenti, non causano le classiche polmoniti da inalazione massiva di cibo, ma inducono al massimo la comparsa di sfumati infiltrati parenchimali nelle parti declivi dei polmoni [19].

Per quantificare la presenza di lipofagi nel BALF, si ricorre ad una valutazione semi-quantitativa degli stessi, consistente nel valutare in maniera sequenziale 100 macrofagi e dando a ciascuno di essi uno score tra 0 (assenza totale di ogni gocciola di grasso nel citoplasma) e 4 (goccioline di grasso così numerose e grosse da oscurare anche il nucleo e gli altri dettagli cellulari). Sommando lo score di 100 macrofagi si arriva così a formulare il cd *Lipid Index* (LI), il cui valore teorico può variare da 0 (assenza totale di lipofagi) a 400 (tutti i lipofagi presentano score 4).

Poiché rari lipofagi alveolari si possono riscontrare anche nel BALF di soggetti normali, esiste il problema oggettivo di fissare un valore cut-off per il LI, oltre il quale si passa dalla normalità alla patologia. In letteratura tale valore è stato fissato generalmente a 100 [20], ma tali studi sono stati fatti includendo anche gran parte di pazienti neurologici, con inalazione cronica di cibo durante la deglutizione. In questi pazienti le turbe della deglutizione si possono sospettare già semplicemente verificando se compare tosse durante il pasto, o con ulteriore sicurezza con lo studio della deglutizione con MdC, che se inalato genera una tracheo/broncografia. In realtà in questi pazienti non vi sono quindi le indicazioni ad eseguire un BAL per ricerca dei lipofagi.

Invece nei pazienti con sintomi respiratori ricorrenti (laringo e/o broncospasmi, tosse, infezioni broncopolmonari) di incerta origine e poco responsivi alle usuali terapie mediche, in cui si possa sospettare che in realtà alla base vi possa essere una misconosciuta malattia da reflusso gastro-esofageo con sintomi sovraesofagei, vi sono forti indicazioni ad eseguire un BAL, proprio per la ricerca dei lipofagi alveolari.

Sottoponendo questi pazienti, senza problemi neurologici e senza inalazione alla deglutizione, sia alla pHmetria esofagea che al BAL, nella nostra esperienza un valore di *Lipid Index* >20 era significativamente correlato con una pHmetria positiva per RGE. Una pHmetria patologica non si associa però invariabilmente ad un LI >20. In pazienti con una pHmetria positiva per RGE e sintomi respiratori, non sempre questi derivano dall'inalazione di materiale alimentare nelle vie respiratorie: basta che si instauri un'esofagite per causare tosse riflessa, ed anche quando il reflusso è tale da risalire fino al laringe, il laringospasmo o la tosse che scatenano vanno intesi come meccanismi di difesa, tendenti a proteggere le vie aeree inferiori dall'inalazione. Nella nostra esperienza è più facile trovare valori patologici di *Lipid Index* entro

i 2-3 anni di età piuttosto che nei pazienti più grandi, quando i riflessi di difesa come la tosse diventano più validi [21].

È poi importante notare che valori patologici di LI sono facilmente associati ad uno spiccato aumento della cellularità totale, dovuto esclusivamente ad uno spiccato aumento della quota di neutrofili, che può arrivare fino al 70%-80% della conta differenziale (Fig. 3). Tale aumento, paragonabile a quello che si riscontra nei BALF ottenuti nelle polmoniti batteriche, si accompagna ad esami colturali negativi per germi comuni.

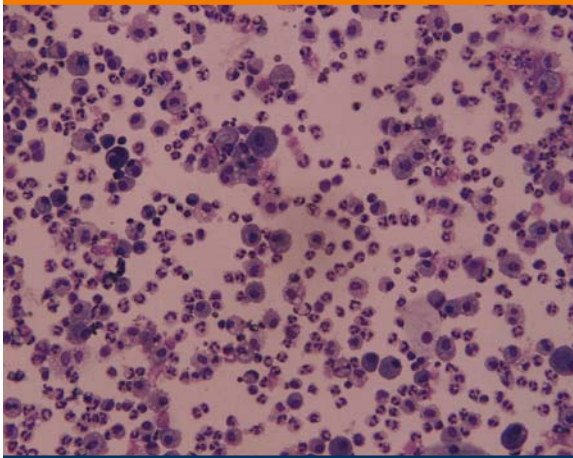


Fig. 3. BAL con assoluta predominanza di neutrofili in un caso di un bambino di 2 anni con malattia da reflusso gastroesofageo e sintomi respiratori ricorrenti: broncospasmo ricorrente/persistente, tosse scatenante vomito. L'estrema neutrofilia del BAL (non dissimile da quella che si può riscontrare in un episodio di broncopneumite batterica) può rendere difficile l'esecuzione e la lettura del *Lipid Index*

Abbiamo potuto dimostrare che l'afflusso di neutrofili è causato dalla produzione da parte della mucosa bronchiale di IL-8, chemochina che induce la chemiotassi dai neutrofili verso la sua zona di rilascio. La secrezione di questa interleuchina è la risposta della mucosa bronchiale all'esposizione, durante le ricorrenti microinalazioni, al pH acido dei succhi gastrici, tanto che un efficace tamponamento gastrico come quello ottenuto con gli inibitori della pompa protonica (PPI) tende a normalizzare la percentuale dei neutrofili [22].

In conclusione, la ricerca dei lipofagi alveolari e la loro quantizzazione con il LI nei pazienti con sospetto clinico di reflusso gastro-esofageo è l'unica maniera per dimostrare che effettivamente gli eventi di reflusso sono tali da causare ricorrenti microinalazioni. La forza di questa indagine risiede anche nel fatto che, essendo il macrofago la cellula residente a livello alveolare, con un'emivita di alcuni mesi, il LI è la somma temporale delle inalazioni che hanno raggiunto il polmone profondo nei mesi precedenti, non diversamente dall'Hb glicosilata, espressione dei valori medi della glicemia nelle settimane precedenti al prelievo.

Ricerca e diagnosi della proteinosi alveolare

Nella proteinosi alveolare, sia congenita che acquisita, il BALF ha un aspetto lattescente. Nei preparati con citocentrifuga e colorati con May-Grunwald Giemsa si osservano voluminosi macrofagi alveolari, il cui citoplasma è ripieno di vacuoli, intervallati da materiale amorfo extracellulare basofilo. Questo materiale e le inclusioni citoplasmatiche dei macrofagi mostrano una colorazione rosa con l'acido periodico di Schiff.

La caratterizzazione poi delle componenti del surfactante che si accumulano nel BAL, come le apoproteine del surfactante, permette poi una miglior caratterizzazione del tipo di proteinosi, con differenziazione delle forme primitive o congenite da quelle secondarie o acquisite [23, 24].

Analisi microbiologica del BALF

Il BALF è molto utile per la ricerca di microrganismi, ma l'interpretazione delle comuni indagini microbiologiche eseguite su di esso è complicata dalla frequente contaminazione da parte di materiale orofaringeo che il paziente può inalare durante l'endoscopia, quando le corde vocali sono tenute aperte dal passaggio dell'endoscopio.

Considerazioni simili devono essere tenute in mente quando si passa con l'endoscopio attraverso il rinofaringe: se vi sono delle secrezioni che oscurano la visuale è saggio non rimuoverle aspirandole attraverso l'endoscopio, se non si vuole che il canale operativo sia contaminato dalla flora (mista) del canale orale. Questo è tanto più importante qualora si debbano studiare gli infiltrati polmonari dei pazienti immunocompromessi: in questi casi anche germi classificati come saprofiti ed usuali commensali del cavo orale possono invece essere i veri responsabili della patologia polmonare [25].

I criteri su cui ci si basa per distinguere le vere infezioni polmonari dalla semplice contaminazione sono essenzialmente:

- 1) Esami colturali con valutazione semiquantitativa della carica batterica.

Lo sviluppo di più di 10^5 di colonie batteriche, inoculando nel terreno di coltura 1 ml di BALF della quota alveolare, si è dimostrato diagnostico per la presenza di broncopolmonite. I dati microbiologici devono però essere sempre correlati con gli altri dati clinici: anche lo sviluppo di specie microbiche saprofiti del cavo orale può avere importanza clinica se il paziente è immunocompromesso.

- 2) Ricerca diretta dei batteri.

La colorazione standard è quella di gram; mentre la presenza di cellule epiteliali squamose con batteri adesi alla superficie è prova di inalazione di materiale orale, il riscontro di neutrofili e/o macrofagi fagocitanti batteri è un sicuro indice di infezione polmonare in atto (Fig. 4). Per la ricerca diretta di altri patogeni si ricorre a colorazioni specifiche o a metodi-

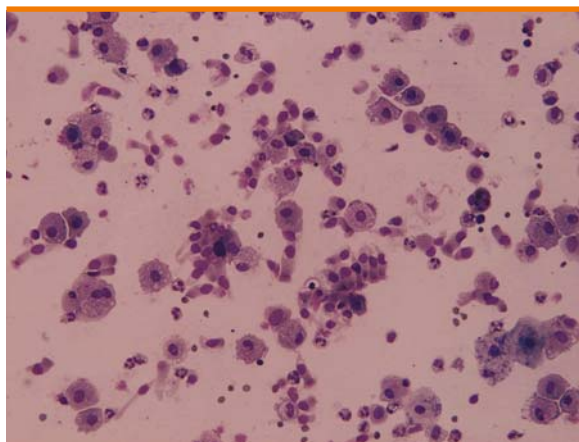


Fig. 4. Paziente con distelettasia del lobo medio ed infezioni ricorrenti in tale sede; BAL eseguito nel lobo medio in periodo di benessere. La discreta quota di neutrofili è spia delle infezioni ricorrenti, anche se l'esame colturale del BAL è poi risultato negativo

che di biologia molecolare. Con la colorazione argentina di Grocott si evidenziano bene sia le ife fungine che le inclusioni intracellulari caratteristiche del *Pneumocystis carinii*. Con la colorazione di Ziehl-Neelsen si identificano classicamente i micobatteri. Per la diagnostica precoce delle infezioni virali come nel caso del citomegalovirus si impiegano tecniche di immunoistochimica e di immunofluorescenza, che impiegano anticorpi monoclonali, specifici per i vari antigeni virali.

3) Tecniche di biologia molecolare.

Si ricerca una particolare sequenza di basi (DNA o RNA), specifica di un determinato patogeno. Potenti metodiche di amplificazione del segnale, come la *polymerase chain reaction* (PCR), permettono di moltiplicare anche per molti ordini di grandezza la sequenza genica in studio (in teoria basta la presenza anche di una sola copia della sequenza in studio). La PCR attualmente è molto impiegata in clinica nella ricerca di cariche batteriche molto esigue, come spesso avviene nelle micobatteriosi. In questo particolare campo di applicazione la PCR permette inoltre la conferma di infezione entro poche ore, senza dover aspettare il risultato di lunghi esami colturali, come è la regola nelle micobatteriosi [26]. La biologia molecolare assume anche un importante ruolo nella dimostrazione di eventuali multiresistenze ai farmaci da parte del micobatterio tubercolare, in quanto lo sviluppo della multiresistenza si associa a specifici marcatori genici [27].

Riguardo a tutti questi studi di microbiologia, per una corretta valutazione dei risultati, bisogna comunque sempre tener presenti queste considerazioni:

- la presenza di un microrganismo nel BALF è diagnostica solo se lo stesso non è mai anche un semplice colonizzatore delle vie aeree, come può accadere invece nel caso dell'aspergillo, candida, micobatteri atipici, CMV, HSV. L'identificazione invece di un organismo che abitualmente non si trova nelle vie aeree, come il *Pneumocystis carinii* (Fig. 5), *M. tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella*, *Nocardia*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, virus influenzali, RSV, è di per sé diagnostica.
- Per le considerazioni sovraesposte, le tecniche di PCR, amplificando enormemente il segnale, sono quelle che in particolare possono generare falsi positivi, identificando organismi che non sono cause di infezione. Per evitare questo, attualmente si usano tecniche di PCR semiquantitative [28].
- Ogni risultato deve sempre essere valutato nel contesto clinico generale, con particolare riguardo allo stato immunitario del paziente nonché, se il paziente ha ricevuto un trapianto di midollo, a che distanza di questo si è eseguito il BAL [29].

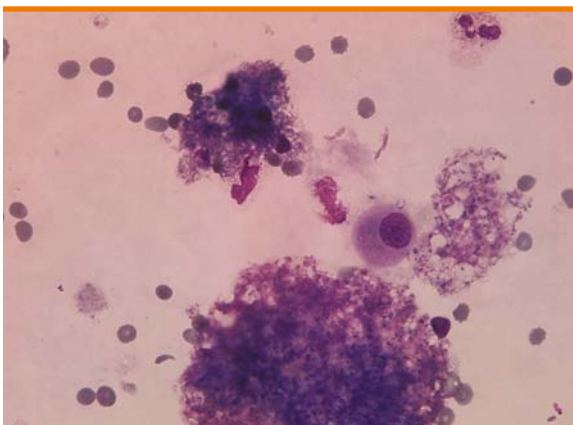


Fig. 5. Polmonite da *Pneumocystis carinii*. Colorazione con Diff Quick che, anche se non è una colorazione argentea, riesce a ben dimostrare la presenza di voluminosi ammassi diagnostici della forma trofozoitica

INDICAZIONI CLINICHE CONCLUSIVE

Valutando le possibilità diagnostiche del BAL come sopraesposte, e differenziando i pazienti pediatrici immunocompetenti da quelli immunocompromessi, le indicazioni ad eseguire il BAL in questi due gruppi di pazienti possono essere così riassunte.

Pazienti immunocompetenti:

1. il BAL andrebbe eseguito in ogni paziente che presenti malattia interstiziale polmonare, per poter valutare il tipo di infiammazione (alveolite) in atto ed aiutare così a formulare una diagnosi e porre una terapia;
2. nel caso poi in cui si sospetti la presenza di una polmonite lipoidea da inalazione di materiale alimentare, come nella malattia da reflusso con sintomi sovraesofagei, o un'emorragia alveolare in atto, in questi casi il BAL non solo orienta la diagnosi, ma riveste un ruolo essenziale nel processo diagnostico.

Pazienti immunocompromessi: eseguire il BAL in caso di:

1. inizio acuto di tachidispnea, ipossiemia e comparsa di infiltrati polmonari: eseguire subito il BAL, ancor prima di iniziare la terapia antibiotica; qualora questa sia stata già iniziata, il BAL andrà eseguito in quei pazienti che non mostrino miglioramento clinico;
2. comparsa di un unico infiltrato polmonare, che non risponda dopo 48 ore di terapia antibiotica ad ampio spettro;
3. nelle polmoniti croniche interstiziali, sia nei pazienti HIV che non HIV.

BAL TERAPEUTICO

Il BAL può anche essere impiegato, anche se molto raramente, a scopo terapeutico, per rimuovere da un lobo o da un intero polmone sostanze nocive. Queste possono essere sia di origine esogena, come nella polmonite lipoidea da inalazione cronica di oligominerale, sia endogena, come nella proteinosi alveolare (congenita o acquisita).

In questi casi, poiché il lobo o il polmone che viene "lavato" viene effettivamente inondato di soluzione fisiologica, viene posizionato un catetere a palloncino prossimamente alla zona di esecuzione del BAL, così che gli altri distretti polmonari sono risparmiati. Il lavaggio viene eseguito instillando ed aspirando in maniera sequenziale grosse aliquote di soluzione fisiologica (40-50 ml), continuando la metodica fino a che il liquido aspirato non appaia limpido, ovvero non contenga più lipidi [30-32].

BIBLIOGRAFIA

1. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children (2000) Bronchoalveolar lavage in children. *Eur Respir J* 15:217-231
2. Bahal-O'Mara N, Nahata MC, Murray RD et al (1994) Sedation with meperidine and midazolam in paediatric patients undergoing endoscopy. *Eur J Clin Pharmacol* 47:319-323
3. Amitai Y, Zylber KE, Avital A et al (1990) Serum lidocaine concentrations in children during bronchoscopy with topical anesthesia. *Chest* 98:1370-1373
4. Shaw CA, Kelleher AA, Gill CP et al (2000) Comparison of the incidence of complication at induction and emergence in infants receiving oral atropine versus no premedication. *Br J Anaesthesia* 84:174-178
5. Klech H, Pohl W and the European Society of Pneumology task Group on BAL (1989) Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 2:561-585

6. Ratjen F, Brunch J (1996) Adjustment of bronchoalveolar lavage volume to body weight in children. *Pediatr Pulmonol* 21:184-188
7. Morrow B, Futter M, Argent A (2004) A simple method of reducing complications of paediatrics nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage. *Pediatr Pulmonol* 38:217-221
8. McNamara PS, Ritson P, Selby A et al (2003) Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch Dis Child* 88:922-926
9. Pesci A, Majori M, Caminati A (2004) Bronchoalveolar lavage in intensive care units. *Monaldi Arch Chest Dis* 61:39-43
10. Weiss S, Hert R, Gianola F et al (1993) Complications of fiberoptic bronchoscopy in thrombocytopenic patients. *Chest* 104:1025-1108
11. Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R (2001) Proteomics as the tool to search for lung disease markers in bronchoalveolar lavage. *Dis Markers* 17:271-284
12. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M et al (1994) Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J* 7:1865-1870
13. Riedel J, Grigg J, Stone C et al (1995) Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 152:163-168
14. Midulla F, Villani A, Merolla R et al (1995) Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol* 20:112-118
15. Barbato A, Panizzolo C (2000) Chronic interstitial lung disease in children. *Paediatr Respir Rev* 1:172-178
16. Ratjen F, Bredendiek M, Zheng L et al (1995) Lymphocytes subsets in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 152:174-178
17. Refabert L, Rambaud C, Mamou-Mani T et al (1996) CD 1a-positive cells in bronchoalveolar lavage samples from children with Langhans cell histiocytosis. *J Pediatr* 129:913-915
18. Sacco O, Fregonese B, Silvestri M, Rossi GA (1999) Fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in the management of children with gastroesophageal reflux. In: Dal Negro RW, Allegra L (eds) *Pneumological aspects of gastroesophageal reflux*. Springer-Verlag, Milano, pp 167-174
19. Sacco O, Fregonese B, Silvestri M et al (2000) Bronchoalveolar lavage and esophageal pH monitoring data in children with "difficult to treat" respiratory symptoms. *Pediatr Pulmonol* 30:313-319
20. Colombo JL, Hallenberg TK (1987) Recurrent aspiration in children: lipid-laden alveolar macrophages quantitation. *Pediatr Pulmonol* 3:86-89
21. Sacco O, Fregonese B, Silvestri M et al (2000) Bronchoalveolar lavage abnormalities in children with gastroesophageal reflux and "difficult to treat" respiratory symptoms: correlation with pHmetry data. *Pediatr Pulmonol* 30: 313-319
22. Sacco O, Silvestri M, Sabatini F et al (2006) IL-8 levels and airway neutrophilia in children with gastroesophageal reflux and asthma-like symptoms. *Respir Med* 100:307-315
23. Mahut B, Delacourt C, Mamou-Mani T et al (1996) Pulmonary alveolar proteinosis. *Pediatrics* 97:117-122
24. Wang B, Stern E, Schmidt RA, Pierson DJ (1997) Diagnosing pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 111: 460-466
25. Feller-Kopman D, Ernst A (2003) The role of bronchoalveolar lavage in the immunocompromised host. *Semin Respir Infect* 18:87-94
26. Delacourt C, Povera JD, Chureau C et al (1995) Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 126:703-709
27. Goyal M, Shaw RJ, Banerjee DK et al (1997) Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 10:1120-1124
28. Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J et al (2003) Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 41:4304-4311
29. Yen KT, Lee AS, Krowka MJ, Burger CD (2004) Pulmonary complication in bone marrow transplantation: a practical approach to diagnosis and treatment. *Clin Chest Med* 25:189-201
30. Bussieres JS (2001) Whole lung lavage. *Anesthesiol Clin North America* 19:543-558
31. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K (2003) Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 349:2527-2539
32. De Blic J (2004) Pulmonary alveolar proteinosis in children. *Paediatr Respir Rev* 5:316-322