

Il lavaggio broncoalveolare nelle pneumopatie infiltrative diffuse

Alberto Pesci, Maria Majori

-
- INTRODUZIONE
 - TRATTAMENTO DEL LIQUIDO DI LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE
 - VALORI CELLULARI DI RIFERIMENTO
 - IL BAL NELLA DIAGNOSTICA DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE
 - Malattie infettive
 - Malattie neoplastiche
 - Proteinosi alveolare
 - Granulomatosi polmonare a cellule di Langerhans
 - Sarcoidosi
 - Polmonite da ipersensibilità
 - Pneumoconiosi
 - Alveolite emorragica
 - Polmoniti eosinofile
 - Danno polmonare da farmaci
 - Connettiviti
 - *Acute respiratory distress syndrome* (ARDS) e polmonite interstiziale acuta (AIP)
 - Bronchiolite obliterante-polmonite organizzativa (BOOP) e polmonite organizzativa criptogenetica (COP)
 - Polmonite interstiziale non specifica (NSIP)
 - Fibrosi polmonare idiopatica (UIP)
 - Polmonite interstiziale linfocitaria (LIP)
 - Polmonite interstiziale desquamativa (DIP)
 - IL BAL NELLO STAGING, PROGNOSI E MONITORAGGIO DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE
 - IL BAL NEL TRATTAMENTO DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE
 - CONCLUSIONI
-

■ INTRODUZIONE

Le pneumopatie infiltrative diffuse costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate, istologicamente, dalla presenza di un danno a carico della parete alveolare che può essere infiltrata da cellule infiammatorie/neoplastiche/fluidi/tessuto connettivo. Si parla di forme “diffuse” per sottolineare l’interessamento non solo dell’interstizio, ma anche delle strutture acinari e bronchiolari.

Il lavaggio broncoalveolare (BAL) è una tecnica che permette il recupero di componenti cellulari e non dalla superficie epiteliale del tratto respiratorio inferiore e differisce dal lavaggio bronchiale che consente, invece, il campionamento delle vie aeree di calibro maggiore. Il BAL, correttamente eseguito, campiona circa un milione di alveoli.

Anche se in corso di pneumopatia infiltrativa diffusa il BAL ha valore diagnostico solo in casi selezionati, spesso, nel giusto contesto clinico-radiologico può supportare un determinato sospetto diagnostico ovvero escluderlo orientando altrimenti la diagnosi [1, 2].

Il presupposto dell’utilizzo clinico del lavaggio broncoalveolare (BAL) in corso di pneumo-

patie infiltrative diffuse è la dimostrazione di una correlazione tra le cellule infiammatorie ed effettrici del BAL e quelle ottenute da campioni bioptici polmonari [3].

La procedura deve essere effettuata nelle zone con maggiore coinvolgimento all'imaging radiologico, preferibilmente utilizzando come guida la tomografia assiale computerizzata ad alta risoluzione (HRCT) del torace.

Nelle forme diffuse le sedi ottimali, a paziente supino, sono il lobo medio e la lingua.

■ TRATTAMENTO DEL LIQUIDO DI LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE

La tecnologia del BAL non è completamente standardizzata anche se sono state pubblicate linee guida e raccomandazioni per un uso standardizzato della procedura e della processazione del materiale biologico [4, 5]. Dopo il recupero, il liquido di lavaggio broncoalveolare viene filtrato attraverso uno strato di garza chirurgica per rimuovere il muco. Solo in particolari condizioni l'aspetto macroscopico del BAL può già fornire utili indicazioni (lattescente e torbido nella proteinosi alveolare, emorragico nell'alveolite emorragica). Ne viene rilevata in un cilindro graduato la quantità totale e valutata la cellularità mediante conta delle cellule in camera di Bürker. Il liquido di lavaggio viene quindi centrifugato a 800 giri/min per 10 min (possibilmente a 4°C). Il sovrantante viene stoccato in diverse aliquote a -60° e poi utilizzato per eventuali determinazioni proteiche. Le cellule sono risospese, lavate due volte in soluzione salina tamponata con fosfati (priva di Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) e centrifugate a 800 giri/min per 10 min (possibilmente a 4°C). Il sedimento cellulare finale viene in parte citocentrifugato su vetrini per essere analizzato con metodiche citologiche e immunocitochimiche ed in parte trattato per l'analisi citofluorimetrica. Analisi di routine comprendono la conta cellulare differenziale e la determinazione delle sottopopolazioni linfocitarie.

I diversi tipi cellulari (macrofagi alveolari, linfociti, neutrofilo ed eosinofili) sono identificati (colorazione di May Grunwald Giemsa) mediante criterio morfologico che permette, inoltre, di apprezzare alterazioni cellulari a volte di per sé patognomoniche: es. presenza di cellule neoplastiche, cellule con effetti citopatici da infezione virale, siderofagi, etc. La conta cellulare differenziale viene effettuata utilizzando un microscopio ottico a x1000 contando 200-500 cellule in campi random. Vengono contati ed espressi come percentuale delle cellule totali: macrofagi, linfociti, neutrofilo ed eosinofili. Nel citocentrifugato possono essere anche evidenziate cellule epiteliali ciliate di origine bronchiale e cellule epiteliali piatte di origine orofaringea. Tali cellule devono essere contate ma non incluse nella conta cellulare differenziata. Si dice che un BAL ben eseguito deve contenere meno del 5% di cellule epiteliali ciliate e meno dell'1% di cellule epiteliali piatte. In aggiunta alla colorazione normale di May Grunwald Giemsa, speciali colorazioni possono essere utilizzate in relazione ad un determinato sospetto clinico: es. colorazione per il ferro (*Perl*) nel sospetto di alveolite emorragica, colorazione di *Papanicolau* per l'identificazione di cellule neoplastiche o inclusioni nucleo-citoplasmatiche virali, colorazione *Oil red* nel sospetto di polmonite lipoidea, colorazione *PAS* nel sospetto di proteinosi alveolare. Nell'ipotesi di forme infettive risultano utili le colorazioni *gram* (batteri), *Ziehl Nielsen* (micobatteri), *Silver-Metenamina* (funghi).

Per l'analisi dei markers di superficie (es. fenotipo linfocitario) vengono impiegate metodiche di immunocitochimica o metodiche di citometria a flusso attraverso l'uso di anticorpi monoclonali. I vantaggi di quest'ultima metodica rispetto alla prima consistono nel fatto che permette l'analisi contemporanea di più parametri (anche fino a 8 contemporaneamente), di grandi quantità di cellule in tempi brevi, infine consente di eseguire ulteriori analisi a posteriori sui dati in memoria.

Indagini immunocitochimiche possono essere utilizzate per la individuazione di cellule *CD1a* (sospetto di granulomatosi polmonare a cellule di Langerhans).

In citofluorimetria il panel di anticorpi monoclonali utilizzati routinariamente sono il *CD3* (linfociti T), *CD19/CD20* (linfociti B), *CD4* (linfociti T helper), *CD8* (linfociti T suppressor), *CD16CD56* (*natural killer*). Solo in casi particolari (quando i linfociti B sono superiori all'8%) si quantificano le catene leggere di superficie Kappa e Lambda.

■ VALORI CELLULARI DI RIFERIMENTO

In soggetti sani non fumatori la cellularità del BAL è di circa 170000-200000 cellule/ml e la popolazione cellulare predominante sono i macrofagi alveolari che costituiscono l'80%-90% delle cellule totali. I linfociti costituiscono il 5%-15%, circa il 70% sono linfociti T con un rapporto *CD4/CD8* dell'1,5-2, l'1% sono linfociti B e il 10%-20% sono cellule *natural killer*. I polimorfonucleati neutrofili (PMN) sono l'1%-3%, gli eosinofili sono <1% così pure i mastociti [6]. In individui fumatori si osserva aumento della cellularità totale (200000-300000 cellule/ml) e modesto incremento della popolazione neutrofila (3%-5%) [6].

In pazienti con pneumopatie infiltrative diffuse possono verificarsi variazioni nella resa e nella conta cellulare differenziale; peraltro, anche variabili quali l'età, abitudine tabagica, assunzione di farmaci, tecnica di esecuzione del BAL, tecnica di trattamento del BAL possono influenzarne il reperto. La fibrobroncosopia può provocare traumatismi con conseguente presenza di abbondanti emazie. Un trattamento del campione o una colorazione non adeguati possono condizionare l'identificazione cellulare al microscopio.

Campioni non soddisfacenti contengono meno di due milioni di cellule in totale, cellule epiteliali ciliate >5%, cellule epiteliali piatte oro-faringee >1%, essudato mucopurulento, eccessive emazie da traumatismo, cellule degenerate per cattiva conservazione.

La determinazione di componenti non cellulari (immunoglobuline, mediatori della flogosi, citochine etc.) è complessa e l'utilizzo controverso a causa della variabilità del recupero. Queste componenti vengono espresse come unità/mg di albumina o come unità/ml di BAL.

■ IL BAL NELLA DIAGNOSTICA DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE

Il BAL nelle pneumopatie infiltrative diffuse è utilizzato a fini clinici nella diagnostica, *staging*, monitoraggio e terapia (proteinosi alveolare).

Il BAL è diagnostico in caso di malattie infettive, malattie neoplastiche, proteinosi alveolare e granulomatosi a cellule di Langerhans polmonare.

Malattie infettive

In questo capitolo faremo solo pochi cenni all'utilizzo del BAL nelle forme infettive in quanto già esaminate in un altro capitolo. L'isolamento dei seguenti germi nel BAL risulta essere diagnostico: *Pneumocystis jiroveci* (Fig. 1), *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides* spp., *Legionella*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatididis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Respiratory Syncytial Virus*.

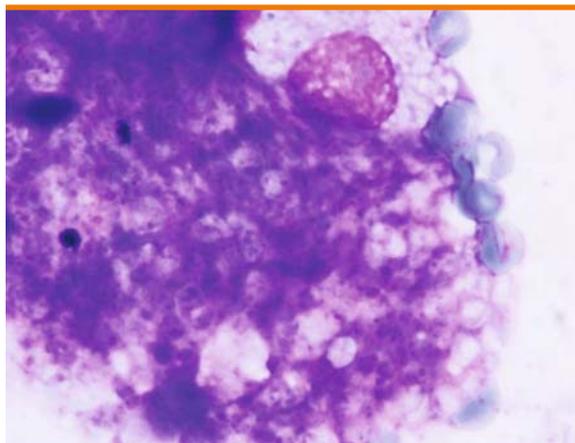


Fig. 1. Sedimento di BAL in soggetto immunodepresso con polmonite da *Pneumocystis jirovecii*. Accanto ad un macrofago alveolare è presente essudato con aspetto schiumoso. L'aspetto schiumoso è determinato dalla presenza di cisti sia otticamente vuote sia contenenti trofozoiti (May Grunwald Giemsa, x1000)

Germi il cui isolamento non è diagnostico ma può orientare la diagnosi ed il trattamento sono: *herpes simplex*, *cytomegalovirus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, micobatteri atipici, batteri (cfu > 10⁴).

Malattie neoplastiche

La valutazione citologica delle cellule ottenute con il BAL può essere utile nella diagnosi di tumori polmonari periferici (non visibili endoscopicamente) sia primitivi che secondari, infatti la sua resa diagnostica è del 65%-70% [7]. Nel carcinoma bronchiolo-alveolare l'analisi del sedimento del BAL consente spesso di ritrovare cellule neoplastiche alveolari ben differenziate (Fig. 2); tale reperto però non consente di differenziarlo dall'adenocarcinoma primitivo o dall'adenocarcinoma metastatico polmonare. La resa diagnostica varia, a seconda delle casistiche dal 70% al 93% [8, 9]. Nella linfangite carcinomatosa il sedimento del BAL permette spesso di osservare la presenza di cellule neoplastiche (65%-83%) ed un aumento aspecifico della popolazione linfocitaria [9, 10]. Va segnalato che i pneumociti reattivi ed iperplastici di II tipo che si osservano nel sedimento del BAL in corso di diverse polmoniti interstiziali idiopatiche e nella fase organizzativa del danno alveolare diffuso possono mostrare atipie tali da essere confusi con cellule tumorali (Fig. 3).

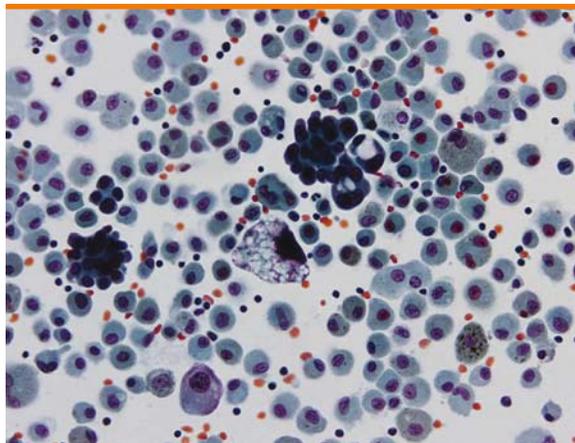


Fig. 2. Sedimento di BAL in soggetto affetto da carcinoma bronchioloalveolare. Immersi in un tappeto di macrofagi alveolari frammentati a pochi linfociti, si osservano due aggregati di cellule ipercromatiche con aspetti di atipia (Papanicolau, x100)

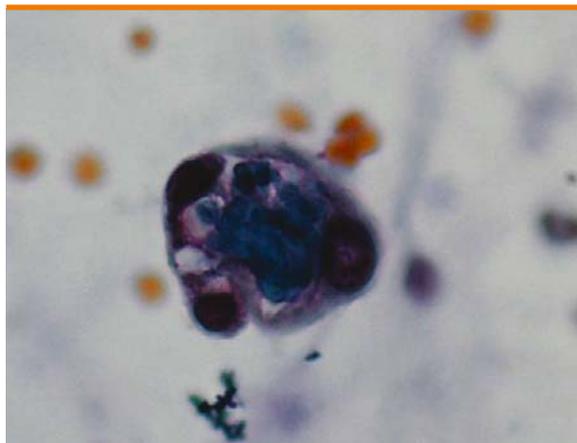


Fig. 3. Sedimento di BAL in corso di ARDS. Immerso in un tappeto di polimorfonucleati neutrofilici ed emazie, si osserva un aggregato cellulare con note di atipia. Al centro del cluster cellulare si osserva materiale amorfo. Tale reperto va interpretato come aggregato di pneumociti iperplastici di II tipo frammentati a frammento di membrana ialina (Papanicolaou, x1000)

Occasionalmente il BAL può essere utile nella diagnosi di linfoma polmonare rivelando la presenza di un aumentato numero di linfociti che opportunamente studiati rivelano aspetti neoplastici [11, 12].

Proteinosi alveolare

Nella proteinosi alveolare il BAL può evitare la necessità di una biopsia in quasi tutti i casi. Va considerata la diagnosi di proteinosi alveolare se, nell'opportuno contesto clinico-radiologico, già all'analisi macroscopica, il BAL si presenta opaco e lattescente [4]. La microscopia ottica evidenzia un sedimento cellulare caratterizzato da poche cellule, grandi corpi acellulati su uno sfondo di materiale amorfo eosinofilo. Il materiale proteinaceo è tipicamente positivo alla colorazione PAS e negativo a quella con Alcian blue. I macrofagi presenti sono ingolfati da materiale PAS-positivo (Fig. 4). Infine, l'esame in microscopia elettronica rivela la presenza di strutture lamellari concentriche (corpi lamellari). Tutte queste caratteristiche risultano essere diagnostiche [4, 13].

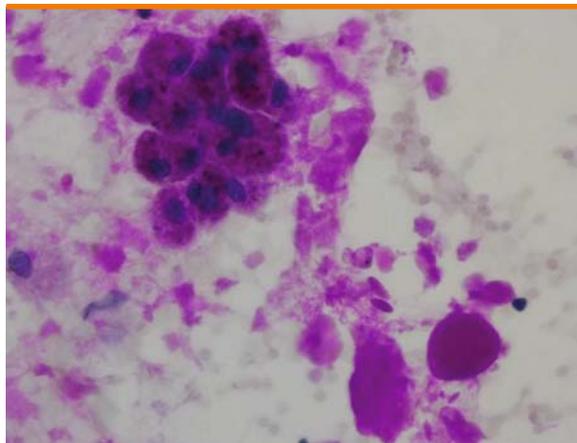


Fig. 4. Sedimento di BAL in soggetto affetto da proteinosi alveolare. Si osserva un aggregato di macrofagi alveolari intensamente PAS-positivi immersi in sedimento di materiale amorfo PAS positivo. Si osserva anche un grosso corpo rotondeggiante acellulato PAS positivo (PAS, x400). Tale reperto è diagnostico di proteinosi alveolare

Granulomatosi polmonare a cellule di Langerhans

Il BAL è caratterizzato da un aumento della cellularità totale, della percentuale dei neutrofili e, talora, degli eosinofili, tale reperto sono però aspecifici. Risulta diagnostico, invece, nel giusto contesto clinico-radiologico, il riscontro di una percentuale di cellule di Langerhans (CD1+) superiore al 5% (Fig. 5) [4, 14]. Va comunque segnalato che le cellule CD1+ possono essere ritrovate in numero aumentato nel BAL di soggetti forti fumatori [15] o con altre pneumopatie infiltrative diffuse [16], in tali condizioni tuttavia esse difficilmente superano il 4%. Al contrario un numero di cellule CD1+ normale non esclude la diagnosi di granulomatosi polmonare a cellule di Langerhans (sensibilità di circa il 50%) [4].

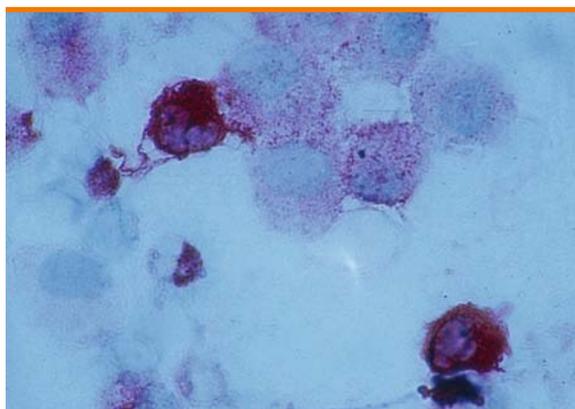


Fig. 5. Sedimento di BAL in soggetto affetto da granulomatosi polmonare a cellule di Langerhans. Accanto ad alcuni macrofagi debolmente colorati si apprezzano due cellule mononucleari (con ampia piega nucleare) con intensa colorazione immunocitochimica rossa per l'anticorpo monoclonale anti-CD1. Tale reperto risulta diagnostico quando il numero delle cellule CD1+ supera il 5% (colorazione immunocitochimica con anticorpo monoclonale anti-CD1, rivelatore Fast Red)

In altre condizioni, quali la sarcoidosi, polmonite da ipersensibilità, pneumoconiosi, alveolite emorragica, polmonite eosinofila, danno polmonare da farmaci, connettiviti, danno alveolare diffuso (DAD), bronchiolite obliterante-polmonite organizzativa e polmoniti interstiziali idiopatiche (NSIP, UIP), il BAL non fornisce un reperto patognomonico, ma, nel giusto contesto clinico-radiologico, può essere di ausilio diagnostico. Addirittura in talune occasioni il BAL può ridirigere la diagnosi verso patologie che non erano ancora state prese in considerazione nella diagnostica differenziale.

Sarcoidosi

Il sedimento del BAL è caratterizzato da un aumento della cellularità totale e della percentuale dei linfociti (>16%) (Tabella 1), anche se il reperto di linfocitosi non è né sensibile né specifico. I linfociti sono di fenotipo prevalente CD4+ per cui si riscontra un rapporto CD4/CD8 aumentato. Un rapporto CD4/CD8>3,5 ha una sensibilità del 53% ed una specificità del 94%, ed è di ausilio diagnostico nei casi in cui non è possibile la conferma istologica [4, 17] (Tabella 2). Una ratio CD4/CD8<1 ha un valore predittivo negativo del 100%. Tuttavia è segnalato che circa il 20% dei pazienti con sarcoidosi possono avere nel BAL una ratio CD4/CD8 normale o ridotta [18]. La diagnosi risulta essere improbabile anche quando nel sedimento del BAL si osservano neutrofili >2% ed eosinofili >1%. I classici reperti di linfocitosi e di aumento delle cellule CD4+ non sono costanti bensì possono variare in relazione alla durata e allo stato di attività della malattia. Né l'entità della linfocitosi né la percentuale di attivazione di queste cellule hanno valore prognostico o possono orientare il trattamento [1, 4, 19].

Tabella 1. Patologie polmonari caratterizzate da alveolite linfocitaria

Sarcoidosi
Berilliosi
Polmonite da ipersensibilità
Silicosi
Polmonite interstiziale linfocitaria (LIP)
Polmonite linfocitaria da farmaci
Connettiviti (per es. sindrome di Sjogren)

Tabella 2. Ratio CD4/CD8 nel BAL di diverse pneumopatie infiltrative diffuse

Aumentata	Normale	Ridotta
Sarcoidosi	Tubercolosi	Polmonite da ipersensibilità
Berilliosi	Linfangioleiomiomatosi	Silicosi
Morbo di Crohn		Farmaci
Artrite reumatoide		BOOP
Cirrosi biliare primitiva		Infezione da HIV

BOOP=bronchiolite obliterante polmonite organizzativa; HIV=human immunodeficiency virus

Polmonite da ipersensibilità

La polmonite da ipersensibilità è caratterizzata dalla presenza di percentuali di linfociti nel BAL (spesso >50% e talora fino al 90%) raramente riscontrabili in altre pneumopatie. Vi è una netta prevalenza di linfociti CD8+ con la ratio CD4/CD8 solitamente ridotta (<1). Alcuni autori hanno evidenziato casi di polmonite da ipersensibilità con linfocitosi a prevalenza CD4 e con ratio CD4/CD8 superiore a 3,5 [18], suggerendo che la ratio CD4/CD8 ha un limitato potere diagnostico. I T linfociti sono a fenotipo CD3+/CD8+/CD56+/CD 57+ [1, 20, 21]. Una neutrofilia nel BAL è indice di esposizione recente o di malattia in fase avanzata fibrosante [20]. La presenza di macrofagi schiumosi e mastociti (>1%) è un reperto costante (Fig. 6) [22]. Un simile pattern (alveolite linfocitaria CD8+, macrofagi schiumosi, mastociti) si può osservare anche nella tossicità polmonare da farmaci, nella polmonite organizzativa criptogenetica e nella polmonite interstiziale nonspecifica (NSIP) (Tabelle 1 e 2). Infine il riscontro di alveolite T linfocitaria con riduzione della ratio CD4/CD8 in un soggetto asintomatico esposto a un possibile antigene scatenante non è da considerare come un indice di malattia bensì solo di esposizione.

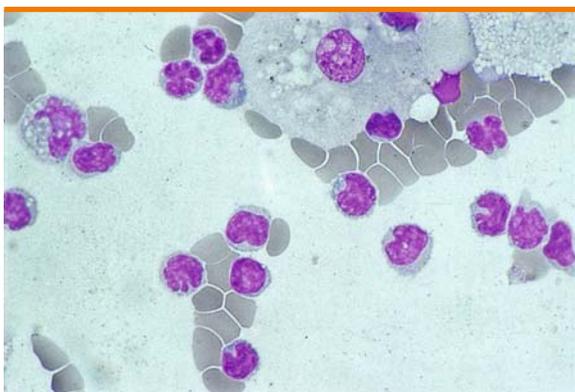


Fig. 6. Sedimento di BAL in soggetto affetto da polmonite da ipersensibilità. È presente un cospicuo numero di linfociti con segni di attivazione (nucleo indentato ed ampio citoplasma) accanto ad alcuni macrofagi con citoplasma di aspetto schiumoso (May Grunwald Giemsa, x1000)

Pneumoconiosi

La presenza di particelle di polvere nei macrofagi alveolari talora birifrangenti (indice di esposizione ai silicati) o di corpi dell'asbesto (corpi ferruginosi) (Fig. 7) o la presenza di cellule giganti con segni di cannibalismo (Fig. 8) (indice di esposizione a metalli duri) nel BAL indirizzano verso l'esposizione a polveri, fibre o sostanze inorganiche potenzialmente patogene [23]. Va comunque sottolineato che normalmente l'inquinamento ambientale sottopone qualsiasi individuo ad inalare particelle inorganiche, di cui si può trovare traccia nel BAL, e che quindi tali reperti non possono essere diagnostici ma sono solo un segno di avvenuta esposizione. Nel BAL di pazienti con silicosi semplice si riscontrano un aumento di macrofagi alveolari e linfociti (Tabb. 1 e 2). Nelle forme avanzate con fibrosi massiva si osserva, invece, un aumento di neutrofili polimorfonucleati [24]. I lavoratori esposti ma non affetti da malattia possono presentare un aumento di linfociti che permette di ipotizzare la presenza di una alveolite subclinica. Nei soggetti esposti all'inalazione di amianto il numero di corpi ferruginosi presenti nel BAL è proporzionale a quello riscontrabile nei tessuti [25].

L'analisi mineralogica con microscopia ottica ed elettronica del BAL permette di confermare l'avvenuta esposizione o altresì di svelare esposizioni misconosciute [26].

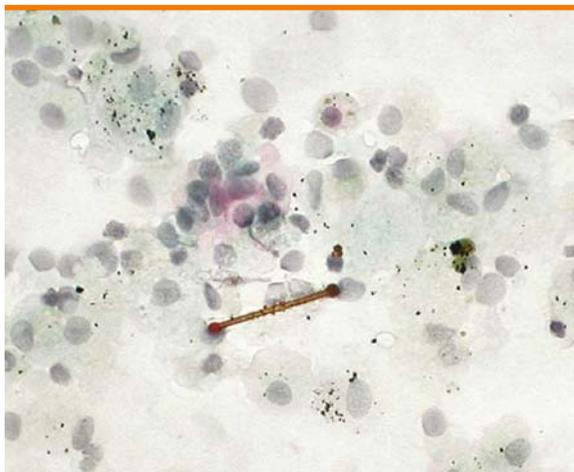


Fig. 7. Sedimento di BAL in soggetto esposto ad amianto. In mezzo ad un sedimento cellulare, caratterizzato da macrofagi alveolari con note di antracosi, spicca un corpo dell'asbesto con aspetto biclavato (Papanicolaou, x100). Tale aspetto non è indice di malattia ma solo di esposizione

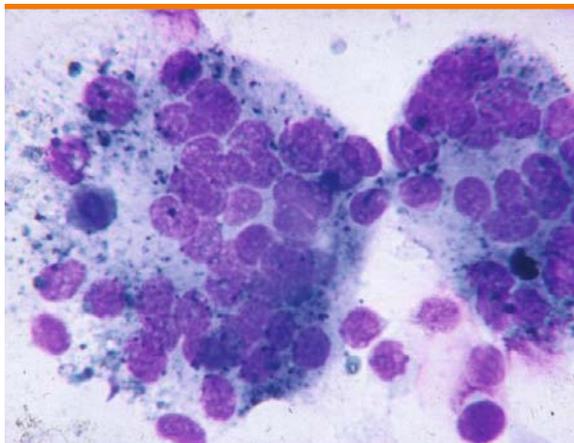


Fig. 8. Sedimento di BAL in soggetto esposto all'inalazione di metalli duri. Nel sedimento accanto ad alcuni macrofagi alveolari si osservano due gigantesche cellule giganti mononucleate con aspetti di cannibalismo (fagocitosi di cellule mononucleate) (May Grunwald Giemsa, x400)

Alveolite emorragica

È un reperto comune a diverse patologie (granulomatosi di Wegener, poliangite microscopica, sindrome di Goodpasture, emosiderosi polmonare idiopatica, connettiviti, reazioni da farmaci etc.) che può essere di entità tale da influenzare l'aspetto macroscopico del BAL (recupero francamente ematico) suggerendo la diagnosi ovvero essere diagnosticata anche in caso di sanguinamento occulto. Il riscontro, poi, nel BAL di macrofagi carichi di emosiderina (siderofagi), indice di sanguinamento verificatosi/insorto da almeno 48 h, permette di discriminare tra sanguinamento dovuto al traumatismo endoscopico e alveolite emorragica vera e propria [4, 27, 28].

Nella granulomatosi di Wegener gli autoanticorpi C-ANCA sono dimostrabili nel sovrantante del BAL; non è chiaro se possano avere un valore predittivo dell'evoluzione [29]. Nel follow-up dei pazienti con vasculiti o connettiviti il BAL viene utilizzato in caso di nuovi infiltrati polmonari per dirimere tra la possibilità di ripresa di malattia, infezione opportunistica o danno da farmaci (ciclofosfamide e metotrexate).

Polmoniti eosinofile

La presenza di eosinofilia isolata nel BAL superiore al 25% deve indurre il sospetto di una polmonite eosinofila (acuta o cronica), una sindrome di Churg Strauss, polmonite eosinofila da farmaci o eosinofilia da parassitosi (Tabella 3) [4, 30, 31] (Fig. 9). Nel giusto contesto clinico-radiologico, la presenza di un'eosinofilia di tale entità permette, quindi, di porre diagnosi evitando il ricorso alla biopsia polmonare. Gli eosinofili sono spesso degranulati ed è frequente osservare macrofagi alveolari in disfacimento. Nel sovrantante è possibile evidenziare un forte aumento dell'ECP.

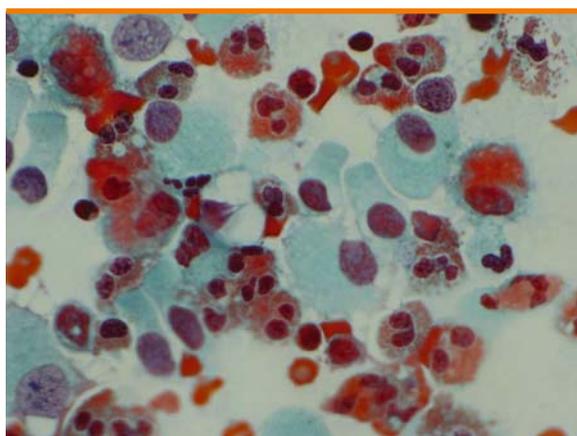


Fig. 9. Sedimento di BAL in soggetto affetto da polmonite eosinofila cronica. Il sedimento è caratterizzato da un abbondante (>50%) componente di polimorfonucleati eosinofili (caratterizzati dal classico nucleo bilobato e granuli citoplasmatici) accanto ad alcuni macrofagi alveolari (Papanicolaou, x400)

Tabella 3. Patologie polmonari caratterizzate da alveolite eosinofila

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| • Polmonite eosinofila acuta | • Polmonite eosinofila cronica |
| • Sindrome di Churg Strauss | • Sindrome ipereosinofila |
| • Eosinofilia polmonare tropicale | • Polmonite eosinofila da farmaci |

La presenza di eosinofilia nel BAL (eosinofili superiori al 5% delle cellule totali) è riportata nel 5% circa dei pazienti sottoposti a questa procedura per diverse cause; nel 40% dei casi si tratta di soggetti affetti da pneumopatie infiltrative diffuse, in quest'ambito poi, i livelli di eosinofilia più elevati (>25%) sono riscontrati in corso di polmonite eosinofila cronica e nella malattia di Churg Strauss [30-32].

Danno polmonare da farmaci

Molti farmaci possono causare danno polmonare, tra quelli più frequentemente implicati vi sono l'amiodarone, il metotressato ed altri chemioterapici. L'analisi del BAL in questi casi può evidenziare la presenza di atipie cellulari, frammenti lipoproteici, alveolite linfocitaria, alveolite neutrofila, alveolite eosinofila, alveolite emorragica, aumento dei macrofagi con aspetto schiumoso (tesaurismi), macrofagi con inclusioni lipidiche [33]. Va comunque sottolineato che uno stesso farmaco può causare diversi tipi di reazione tissutale polmonare, anche in sequenza (Tabella 4).

Tabella 4. Il BAL nelle pneumopatie farmaco-indotte

Farmaci	Danno indotto	Aspetto del BAL
Bleomicina, ciclofosamide, metotressato, nitrosourea, busulfan	Reazione citotossica Frammenti lipoproteici	Atipie cellulari Aumento eosinofili
Acebutololo, amiodarone, azatioprina, bleomicina, busulfan, ciclofosamide, metotressato*, nitrofurantoina, sali d'oro, sulfasalazina, propranololo	Alveolite linfocitaria Aumento linfociti T CD8+	Linfocitosi >40% Riduzione ratio CD4/CD8
Bleomicina, busulfan	Alveolite neutrofila	Aumento neutrofili
Ampicillina, bleomicina, nitrofurantoina, penicillina, sulfasalazina, tetraciclina	Alveolite eosinofila	Aumento isolato degli eosinofili (>25%)
Amfotericina B, penicillamina	Alveolite emorragica	Emazie e siderofagi
Amiodarone	Tesaurismi	Aumento macrofagi con aspetto schiumoso
Olio minerale	Polmonite lipidica	Macrofagi alveolari con inclusioni citoplasmatiche otticamente vuote e colorate in rosso con la colorazione Oil Red

*anche aumento T CD4+

Proprio il metotressato, ad esempio, oltre ad una polmonite interstiziale cronica può causare, anche se meno frequentemente, polmonite organizzativa-bronchiolite obliterante (BOOP), DAD ed edema polmonare. La maggior parte dei pazienti presenta nel BAL un'alveolite T linfocitaria ad alta intensità a prevalente fenotipo CD4+. Sono stati, però, descritti anche casi a prevalente fenotipo CD8+. In alcuni casi è stata riportata neutrofilia. Il BAL è utile soprattutto per escludere forme infettive opportunistiche. La presenza nel sedimento del BAL di cellule epiteliali atipiche può rappresentare un segno precoce di evoluzione verso la fibrosi polmonare [34].

Un aspetto comune del BAL di pazienti trattati con amiodarone con e senza interessamento polmonare è la presenza di numerosi macrofagi "schiumosi". Nei pazienti con lesioni polmonari si osserva invece un'alveolite mista (Tabella 5) caratterizzata da un aumento dei linfociti, dei neu-

trofili e degli eosinofili. I linfociti risultano essere in prevalenza T CD8+ (Tabella 2). Tali aspetti possono essere utili alla conferma della diagnosi ma non hanno valore prognostico [35].

Tabella 5. Patologie polmonari caratterizzate da alveolite mista linfociti e neutrofili

Polmonite organizzativa criptogenetica (COP)
Bronchiolite obliterante-polmonite organizzativa (BOOP)
Connettiviti (es. dermatopolimiosite)
Polmonite interstiziale non specifica (NSIP)
Polmoniti da ipersensibilità croniche

Connettiviti

Una malattia interstiziale diffusa complica il decorso di una connettivite in circa il 5% dei casi e ne è spesso un indice prognostico sfavorevole. Il tipo di interessamento polmonare è il più vario, spaziando da una polmonite interstiziale (NSIP) a quadri di BOOP, fino a forme di fibrosi interstiziale diffusa, del tutto simili alla fibrosi polmonare idiopatica. Il BAL riflette questi eventi patologici rivelando un aumento dei linfociti o neutrofili/eosinofili o di ambedue le componenti cellulari (alveolite mista) (Tabella 6) [36]. Anche in pazienti asintomatici dal punto di vista respiratorio e con lastra del torace normale, il BAL può rilevare alterazioni delle componenti cellulari (Tabella 6). L'importanza prognostica di tale alveolite subclinica in corso di connettivite non è ancora conosciuta [36]. Una alveolite T-linfocitaria subclinica è stata osservata anche in corso di crioglobulinemia mista [37]. In questo caso l'alveolite subclinica non si è dimostrata predittiva, in un follow-up di 5 anni, di manifesta malattia interstiziale diffusa.

Tabella 6. Il BAL nelle connettiviti

Malattia	Con pneumopatia infiltrativa diffusa	Senza pneumopatia infiltrativa diffusa
S. Sjogren primaria	Neutrofili, linfociti (CD8+)	Linfociti (CD4+)
S. Sjogren secondaria	Neutrofili, linfociti	Linfociti
Sclerosi sistemica	Neutrofili, ± eosinofili, ± linfociti	Neutrofili, ± linfociti, ± eosinofili
Artrite reumatoide	Neutrofili, ± linfociti, ± eosinofili	Linfociti (CD4+)
Lupus eritematoso sistemico	Neutrofili, Linfociti	Linfociti
Malattia mista tessuto connettivo	Neutrofili	Neutrofili
Dermato-polimiosite	?	Neutrofili, ± linfociti
Spondilite anchilosante	?	Linfociti, ± neutrofili
Crioglobulinemia mista	?	Linfociti

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) e polmonite interstiziale acuta (AIP)

L'ARDS e l'AIP sono caratterizzate a livello istopatologico dalla presenza di DAD, nell'ARDS è possibile identificare un evento eziologico scatenante (sepsi, trauma, intervento chirurgico, trasfusioni, etc.), mentre nell'AIP no. Nella fase precoce dell'ARDS e dell'AIP, il sedimento del BAL è caratterizzato da un marcato incremento dei neutrofili (>50%) (Tabella 7), mentre in quella tardiva predominano linfociti ed eosinofili. La persistenza di un elevato numero di neutrofili anche nella fase tardiva è considerato un indice prognostico sfavorevole [38, 39]. Nel sedimento, si possono osservare anche pneumociti di II tipo attivati ed aggregati in clusters con atipie morfologiche simil-tumorali (Fig. 3) [40]. Nel sovrinatante sono state riscontrate concentrazioni aumentate di radicali tossici

dell'ossigeno, proteasi e citochine (TNF-alpha, IL-1 e 8). Nei pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva per manifestazioni respiratorie, il BAL risulta di particolare utilità clinica per differenziare l'ARDS da: 1) alveolite emorragica (emazie e siderofagi); 2) polmonite eosinofila acuta (spiccato incremento della popolazione eosinofila); 3) polmonite acquisita da ventilatore (presenza di organismi intracellulari [ICO] ed esami colturali con carica batterica $>10^4$ cfu/ml); 4) neoplasie a rapida progressione come linfangite carcinomatosa, linfoma e leucemia acuta; 5) infezioni opportunistiche polmonari (*Pneumocystis jiroveci*, citomegalovirus, *Aspergillus*, etc.) con associato DAD [41].

Tabella 7. Patologie polmonari caratterizzate da alveolite neutrofila

Fibrosi polmonare idiopatica (UIP)
 Polmonite interstiziale desquamativa (DIP)
 Polmonite interstiziale non specifica (NSIP) variante fibrotica
 Connettiviti (per es. sclerodermia)
 Asbestosi in fase fibrotica
 Polmonite interstiziale acuta (AIP)
 Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

**Bronchiolite obliterante-polmonite organizzativa (BOOP)
 e polmonite organizzativa criptogenetica (COP)**

Il fenomeno istopatologico BOOP non è altro che la fase riparativa successiva a insulti polmonari di varia natura (infettivi, immunologici, tossici). Si parla di COP in caso di forma idiopatica. Il BAL nella BOOP/COP è caratterizzato da un aumento della cellularità totale con riduzione percentuale della popolazioni macrofagica ed aumento di quella linfocitaria ($>40\%$), neutrofila e eosinofila (alveolite mista, Tabella 5) [42, 43]. I linfociti presentano una riduzione della ratio CD4/CD8, la presenza di un numero elevato di linfociti è un fattore predittivo di buona risposta alla terapia steroidea. Sono presenti macrofagi schiumosi e percentuali aumentate di mastociti e plasmacellule [42, 44].

Il pattern misto (aumento dei linfociti CD8+, neutrofilo e talora eosinofilo) non è specifico e lo si può osservare in corso di alveoliti allergiche estrinseche, polmonite interstiziale non specifica e polmonite da farmaci [45].

Polmonite interstiziale non specifica (NSIP)

Circa un 50% dei casi presenta una linfocitosi con rapporto CD4/CD8 ridotto associata ad aumento dei neutrofilo (NSIP-cellulata) simile a quello osservabile in corso di BOOP (Tabella 5) [45]. In un'altra metà dei casi è presente un incremento dei neutrofilo e degli eosinofili (NSIP-fibrotica). Queste due alterazioni del sedimento del BAL possono essere presenti contemporaneamente. Il BAL non permette di discriminare tra una fibrosi polmonare idiopatica (UIP) e una NSIP-fibrotica [46].

Fibrosi polmonare idiopatica (UIP)

Nel BAL, nel 70%-90% dei casi, si osserva un aumento delle cellule totali e della percentuale di polimorfonucleati neutrofilo ($>5\%$) che correlano con l'estensione delle lesioni reticolari in HRTC (Tabella 7). Nel 40%-60% dei casi possono essere aumentati anche i polimorfonucleati eo-

sinofili (>5%). È inoltre riportato anche un aumento dei linfociti nel 10%-20% dei casi. Tale quadro non si differenzia dalla maggior parte delle polmoniti interstiziali idiopatiche o da quello osservabile in altre patologie polmonari fibrosanti (polmoniti da ipersensibilità croniche, NSIP fibrotica, asbestosi, etc.) [1, 6, 46, 47]. Un aumento isolato dei linfociti deve far escludere la possibilità di UIP. Questo valore predittivo negativo del BAL è così importante che nelle recenti linee guida congiunte ATS ed ERS sulla fibrosi polmonare idiopatica il BAL viene assunto come uno dei quattro criteri maggiori per porre la diagnosi clinica in assenza di biopsia chirurgica [48]. Il numero od il tipo di cellule del BAL non hanno valore prognostico e non sono quindi consigliabili controlli seriati nel tempo per controllare l'evoluzione o la risposta al trattamento [46, 47].

Durante le fasi accelerate di malattia, dovute al sovrapporsi di un DAD, il BAL si caratterizza, come nell'AIP e nell'ARDS, per la presenza di marcata neutrofilia (>50%) e presenza di pneumociti di II tipo attivati [49].

Polmonite interstiziale linfocitaria (LIP)

Il BAL si caratterizza per la presenza di un'alveolite T linfocitaria ad alta intensità a prevalente fenotipo CD4+ senza caratteri di monoclonalità (Tabella 1) [50].

Polmonite interstiziale desquamativa (DIP)

Il BAL contiene numerosi macrofagi alveolari con inclusioni caratteristiche bronzo-dorate e antracotiche, indistinguibili da quelle che si possono osservare nei fumatori. L'assenza di queste cellule rende la diagnosi di DIP improbabile. È segnalato anche un aumento percentuale dei polimorfonucleati neutrofili, degli eosinofili e talora dei linfociti [46, 50].

■ IL BAL NELLO STAGING, PROGNOSI E MONITORAGGIO DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE

Anche se, genericamente, in passato era stato suggerito che una linfocitosi del BAL avesse aspetti prognostici positivi (fibrosi polmonare idiopatica e sarcoidosi) [1, 2, 4, 6], al momento è ancora aperto il dibattito se il BAL sia utile per stabilire l'attività di malattia e abbia quindi valore prognostico nell'ambito delle pneumopatie infiltrative diffuse. Allo stesso modo non esistono conferme dell'utilità di BAL seriati nel tempo ai fini del monitoraggio della malattia e delle decisioni terapeutiche [1, 2, 4, 6].

■ IL BAL NEL TRATTAMENTO DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE

Attualmente il BAL trova indicazione terapeutica solo nella proteinosi alveolare, quando presente insufficienza respiratoria, al fine di rimuovere meccanicamente il materiale proteinaceo dagli spazi alveolari. Generalmente viene lavato un intero polmone attraverso un tubo a doppio lume con il paziente in anestesia generale [51]. In soggetti che non possono sopportare tale metodica si sono ottenuti buoni risultati anche con BAL eseguiti in anestesia locale con quantità totali di 200-400 ml, iniettati in varie aliquote, in differenti segmenti e ripetute sedute.

CONCLUSIONI

Il BAL è diventata una procedura diagnostica standard nella maggioranza delle pneumopatie infiltrative diffuse. La tecnica è sicura, minimamente invasiva e in casi selezionati diagnostica (proteinosi alveolare, granulomatosi a cellule di Langerhans, infiltrati tumorali e pneumopatie infettive) [1-6]. In altri casi, il riscontro nella conta cellulare differenziata del BAL di una alveolite linfocitaria, neutrofila, eosinofila o mista può fornire dati utili all'orientamento clinico o utili alla diagnosi (Tabb. 1-7). Se, per esempio, i risultati del BAL sono compatibili con una determinata diagnosi nel giusto contesto clinico-radiologico (HRCT), tale reperto può essere sufficiente a porre la diagnosi. Nella diagnostica della fibrosi polmonare idiopatica il BAL svolge un ruolo predittivo negativo. Il valore clinico della procedura nella stadiazione e nel monitoraggio delle pneumopatia infiltrative è ancora discusso. L'unica indicazione all'impiego del BAL ad uso terapeutico è la proteinosi alveolare.

BIBLIOGRAFIA

1. Costabel U, Guzman J (2001) Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 7:255-261
2. Meyer KC (2004) The role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* 25:637-649
3. Semenzato G, Chilosi M, Ossi E et al (1985) Bronchoalveolar lavage and lung histology. *Am Rev Respir Dis* 132:400-404
4. Klech H, Hutter C, Costabel U (1992) Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage: report of European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir Rev* 2:47-127
5. Klech H, Pohl W (1989) Technical recommendations guidelines for bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2:561-585
6. The BAL Cooperative Group Steering Committee (1990) Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 141:169-202
7. Linder J, Radio SJ, Robbins RA et al (1987) Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of disseminated lung tumors. *Acta Cytol* 31:796-801
8. Sprigmeier SC, Hackman R, Carlson JJ, McClellan JE (1983) Bronchioloalveolar cell carcinoma diagnosed by bronchoalveolar lavage. *Chest* 83:278-279
9. Poletti V, Romagna M, Allen KA et al (1995) Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of disseminated lung tumors. *Acta Cytol* 39:472-477
10. Levy H, Horak DA, Lewis MA (1988) The value of bronchial washings and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of lymphangitic carcinomatosis. *Chest* 94:1028-1030
11. Betsuyaku T (1994) Establishing diagnosis of pulmonary malignant lymphoma by gene rearrangement analysis of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 149:526-529
12. Drent M, Wagenaar SS, Mulder PH et al (1994) Bronchoalveolar lavage fluid profiles in sarcoidosis, tuberculosis, non-Hodgkin's and Hodgkin's disease: an evaluation of differences. *Chest* 105:514-520
13. Milleron BJ (1991) Bronchoalveolar lavage cell data in alveolar proteinosis. *Am Rev Respir Dis* 144:1330-1332
14. Auerswald U (1991) Value of CD-1-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Lung* 169:305-309
15. Casolaro MA, Bernaudin JF, Saltini C et al (1988) Accumulation of Langerhans' cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 137:406-411
16. Chollet S, Soler P, Dournovo P et al (1984) Diagnosis of pulmonary histiocytosis X by immunodetection of Langerhans cells in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Pathol* 115:225-232
17. Costabel U, Bross KJ, Guzman J et al (1986) Predictive value of bronchoalveolar T cell subset for the course of pulmonary sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci* 465:418-426
18. Drent M, Grutters JC, Mulder PH et al (1997) Is the different T helper activity in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis also reflected by the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 14:31-38
19. Poulter LW (1990) The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Eur Respir J* 3:943-944
20. Drent M (1993) Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: effect of time elapsed since antigen exposure. *Eur Respir J* 6:1276-1281

21. Semenzato G, Agostini C, Zambello R et al (1986) Lung T-cells in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional analysis. *J Immunol* 137:1164-1172
22. Pesci A, Bertorelli G, Olivieri D (1991) Mast cells in bronchoalveolar lavage fluid and in transbronchial biopsy specimens of patients with farmer's lung disease. *Chest* 100:1197-1202
23. Costabel U, Teschler H (1990) Inflammation and immune reactions in interstitial lung disease associated with inorganic dust exposure. *Eur Respir J* 3:363-364
24. Christman JW, Emerson RJ, Hemenway DR et al (1991) Effects of work exposure, retirement, and smoking on bronchoalveolar lavage measurements of lung dust in Vermont granite workers. *Am Rev Respir Dis* 144:1307-1313
25. De Vuyst P, Dumortier P, Moulin E et al (1987) Diagnostic value of asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 136:1219-1224
26. Ito E, Kudo R, Miyoshi M et al (1988) Transmission and scanning electron microscopic study of the same cytologic material. *Acta Cytol* 32:588-592
27. Baughman RP (1992) Bronchoalveolar lavage. *Mosby Year Book, St Louis*
28. Perez-Arellano JL, Losa Garcia JE, Garcia Macias MC et al (1992) Hemosiderin-laden macrophages in bronchoalveolar lavage fluid. *Acta Cytol* 36:26-30
29. Hoffman GS, Sechler JMG, Gallin JI et al (1991) Bronchoalveolar lavage analysis in Wegener's granulomatosis. A method to study disease pathogenesis. *Am Rev Respir Dis* 143:401-407
30. Allen JN, Davis WB, Pacht ER (1990) Diagnostic significance of increased bronchoalveolar lavage fluid eosinophils. *Am Rev Respir Dis* 142:642-647
31. Pesci A, Bertorelli G, Manganelli P et al (1988) Bronchoalveolar lavage in chronic eosinophilic pneumonia. Analysis of six cases in comparison with other interstitial lung diseases. *Respiration* 54:16-22
32. Olivieri D, Pesci A, Bertorelli G (1990) Eosinophilic alveolitis in immunologic interstitial lung diseases. *Lung* S:964-73
33. Costabel U, Uzaslan E, Guzman J (2004) Bronchoalveolar lavage in drug-induced lung disease. *Clin Chest Med* 25:25-35
34. Schnabel A, Richter C, Bauerfeind S, Gross WL (1997) Bronchoalveolar lavage cell profile in methotrexate induced pneumonitis. *Thorax* 52:377-379
35. Coudert B, Bailly F, Lombard JN et al (1992) Amiodarone pneumonitis bronchoalveolar lavage findings in 15 patients and review of the literature. *Chest* 102:1005-1012
36. Manganelli P, Salaffi F, Pesci A (1997) Clinical and subclinical alveolitis in connective tissue diseases assessed by bronchoalveolar lavage. *Semin Arthritis Rheum* 26:740-754
37. Manganelli P, Salaffi F, Subiaco S et al (1996) Bronchoalveolar lavage in mixed cryoglobulinaemia associated with hepatitis C virus. *British J Rheumatol* 35:978-982
38. Idell S, Cohen AB (1985) Bronchoalveolar lavage in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 6:459-471
39. Nakos G, Kitsioulis EL, Tsangaris L, Lekka MD (1988) Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. *Intensive Care Med* 24:296-303.
40. Stanley MW, Henry-Stanley MJ, Gajl-Peczalska KJ et al (1992) Hyperplasia of type II pneumocytes in acute lung injury. Cytologic findings of sequential bronchoalveolar lavage. *Am J Clin Pathol* 97:669-677
41. Pesci A, Majori M, Caminati A (2004) Bronchoalveolar lavage in intensive care units. *Monaldi Arch Chest Dis* 61:39-43
42. Costabel U (1992) Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP): the cytological and immunocytological profile of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 5:791-797
43. Majori M, Poletti V, Corradi M et al (2000) Bronchoalveolar lavage in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia primed by radiation therapy to the breast. *J Allergy Clin Immunol* 105:239-244
44. Pesci A, Majori M, Piccoli ML et al (1996) Mast cells in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Chest* 110:383-391
45. Nagai S, Kitaichi M, Itoh H et al (1998) Idiopathic non-specific interstitial pneumonia: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and BOOP. *Eur Respir J* 12:1010-1019
46. Veeraraghavan S, Latsi PI, Wells AU et al (2003) BAL findings in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 22:239-244
47. Haslam PL, Turton CWG, Heard A et al (1980) Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: comparison of cells obtained with lung biopsy and clinical features. *Thorax* 35:9-18

48. ATS/ERS statement (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 161:646-664
49. Ambrosini V, Cancellieri A, Chilosi M et al (2004) Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: report of a series. *Eur Respir J* 22:821-826
50. Nagai S (1998) Classification and recent advances in idiopathic interstitial pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 4:256-260
51. Beccaria M, Luisetti M, Rodi G et al (2004) Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 23:526-531