

# Consensusprotocol voor cytologisch en immunofenotyperings onderzoek op BAL materiaal in het kader van interstitiële longziekten

Opgesteld in naam van de BAL-werkgroep, 2016

## Inleiding

### 1.1 Doel

Dit protocol beschrijft een methode voor isolatie en analyse (morfologisch en flowcytometrisch immunofenotyperings onderzoek) van cellen uit de Broncho-Aveolaire Lavage (BAL) vloeistof. Onderzoek van BAL vloeistof kan een bijdrage leveren aan de differentiatie van de verschillende ziektebeelden binnen de groep van interstitiële longziekten.

Voor de diagnostiek wordt de BAL vloeistof onderzocht op celaantal en leukocyten celdifferentiatie. Voor een goede interpretatie van de resultaten is het van belang dat bij onderzoek naar leukocyten in BAL gelijktijdig bloed onderzocht wordt.

### 1.2 Principe

BAL-vloeistof wordt verkregen door de bronchoalveolaire ruimte meerdere malen te laven met fysiologische zoutoplossing. De cellen die daarmee worden opgezogen bevinden zich in een eiwitarm medium en kunnen lyseren en/of adhereren aan de wand van de opvangfles. Adherentie aan de wand van de buis kan, onder andere, worden tegengegaan door het materiaal direct - op ijs - naar het lab te vervoeren.

Isolatie van cellen uit de BAL-vloeistof vindt plaats voor morfologische differentiatie en flowcytometrisch immunofenotyperings onderzoek. Karakterisering van de verschillende leukocyten is gebaseerd op morfologie en cytologische kleuringen en analyse van de lymfocyten subpopulatie is gebaseerd op het aantonen van specifieke eiwitten of glycoproteïnen (antigenen/markers) die op de celmembraan tot expressie worden gebracht of intracellulair voorkomen. Voor de morfologische differentiatie worden cytospinpreparaten gemaakt van de celsuspensies. Deze worden na een May Grünwald Giemsa (MGG) kleuring, beoordeeld. Voor de detectie van leukocyten antigenen/markers wordt gebruikt gemaakt van direct geconjugeerde monoklonale antistoffen. Door gebruik te maken van antistoffen met verschillende fluorochromen is gelijktijdige detectie van meerdere subpopulaties in een suspensie of van meerdere antigenen op een cel mogelijk.

## Pre-analyse

Voor een juiste interpretatie dienen de volgende items bij de aanvraag te worden vermeld:

- Vraagstelling
- Medicatiegebruik
- Volume in/uit (voor rendement)
- Klinische gegevens
- Roker of niet (gestopt sinds)

### 2.1 Afname van de BAL-vloeistof

- De bronchoalveolaire lavage wordt verricht na premedicatie volgens lokaal protocol.
- Er wordt gelaveerd met minimaal 100 ml (vaak 2-4 x 50ml) steriele fysiologische zoutoplossing of PBS.
- De eerste fractie dient apart te worden gehouden aangezien deze niet representatief is voor de diepere luchtwegen.
- Voor morfologisch en flowcytometrisch immunofenotyperings onderzoek dienen de 2e en volgende fracties gepoold worden. Zet de BAL-vloeistof direct na afname op ijs en verwerk deze binnen max. 4 uur na afname.
- Immunofenotyperings onderzoek van lymfocyten subpopulaties in BAL-vloeistof gaat gepaard met dezelfde typering in perifeer bloed.

### 2.2 Afname van het bloed

- Er wordt vóór het toedienen van de premedicatie, dus vóór de lavage 1 buis (4-7ml) Li-heparine bloed afgenomen (K3-EDTA kan ook).
- Het bloed dient binnen 24 uur na afname bewerkt te worden.

## Analyse

### 3.1 Bewerking BAL

- Houd de BAL en de PBS/BSA (minimaal 0.1% BSA) steeds op smeltend ijs (0°C).
- Bepaal het volume van de BAL-vloeistof (ml), bereken en boordeel het rendement:
  - 60 %: goed rendement
  - 30% en < 60%: matig rendement
  - < 30%: slecht rendement

en noteer het aspect:

- Kleur (kleurloos/ rood/ wit/ bruin)
  - Homogeniciteit (helder/ troebel/ vlokkerig)
  - Slijm (weinig/ veel slijm)
- Filtreer de BAL-vloeistof om slijm te verwijderen. Gebruik hiervoor een zacht filter (poriegrootte 70-100 µm).
  - Bepaal met een celteller het aantal leukocyten en rode bloedcellen (dit laatste om a.d.h.v. de leuko/ery ratio een maat voor de bloedbijmenging in de BAL weer te kunnen geven).
  - Centrifugeer 10 min 490 ±100 x g (4°C).
  - Zuig supernatant af en beoordeel het aspect van het celpellet (kleur).
  - Lyseer eventueel aanwezige erythrocyten volgens een lokaal gangbare methode (NH<sub>4</sub>CL of een commerciële lyseervloeistof).
  - Pool de celpellets in één buis.
  - Was de cellen 2x met PBS/minimaal 0.1% BSA.
  - Centrifugeer 5 min, 491xg (4°C).
  - Zuig de wasvloeistof na de laatste wasstap secuur af.
  - Neem het celpellet op in een bekend volume PBS/minimaal 0.1% BSA, (b.v. 1-4 ml).
  - Breng voor het maken van cytocentrifuge preparaten de celsuspensie op een concentratie van 0.5-1x10<sup>6</sup>/ml.

### 3.2 Morfologische analyse (Cytocentrifuge preparaten)

#### 3.2.1 Bereiding cytospincentrifuge preparaten

- Maak 5-6 cytospin preparaten van een suspensie met een concentratie van 0.5-1 x 10<sup>6</sup>/ml in PBS/BSA 0.1-0.5%.
- Voorzie objectglasjes van naam, datum en materiaalcode.
- Plaats de glasjes in de cytospincentrifuge (matrand boven, beschreven kant naar de opening van het cupje).
- Plaats cytospin-filtreerpapier tussen objectglasje en cupje.
- Draai de glasjes voor met 50 µl PBS/ 0.1-0.5% BSA.
- Pipetteer in de cupjes 50 µl celsuspensie (celconcentratie 0.5x10<sup>6</sup>).
- Centrifugeer 3 min. 1100 rpm.
- Haal de cytospinpreparaten direct na het centrifugeren uit het apparaat.
- Laat de preparaten aan de lucht drogen.
- Beoordeel de kwaliteit van de gemaakte preparaten m.b.v. de lichtmicroscop.

#### 3.2.2 Beoordeling cytocentrifuge preparaten

De glasje worden gekleurd m.b.v. een MayGrünwald Giemsa kleuring waarna er minimaal 300 cellen worden geteld. Hieruit wordt het % neutrofiële granulocyten, eosinofiele granulocyten, mestcellen, plasmacellen, lymfocyten en macrofagen bepaald.

Beoordeel in ieder geval de volgende aspecten:

- fagocytose
- afwijkingen in het algemeen
- specifieke afwijkingen zoals aanwezigheid van:
  - epitheel (plaveisel- en/of trilhaarepitheel)
  - (veel) bacteriën
  - asbestlichaampjes
  - schuimmacrofagen
  - rozetvorming van lymfocyten rondom macrofagen
  - insluitsels aanwezig in cellen
  - beoordeling hemosiderine in macrofagen na ijzerkleuring

### 3.3 Immunofenotyperingsonderzoek

#### 3.3.1 Minimaal inzet panel immunofenotyperingsonderzoek

- Voor immunofenotypering van de leukocyten in de BAL-vloeistof, worden  $0.5 \times 10^6$  cellen (100  $\mu$ l van een suspensie met een concentratie van ca.  $5 \times 10^6$ /ml) met monoklonale antistoffen geïncubeerd volgens het geldende immunofenotyperings protocol voor lymfocytensubset analyse in de BAL.
- Een minimaal protocol ziet er als volgt uit:
  - CD45 als pan-leukocyten merker.
  - CD3, CD4 en CD8 ter bepaling van T-cellen en CD4/CD8 ratio binnen de T-cellen.
  - CD19, CD56, ter bepaling B-cellen en NK-cellen respectievelijk.
  - CD103 ter bepaling van de CD103CD4/CD4 ratio. Een ratio  $< 0.2$  verhoogt de sensitiviteit voor sarcoïdose.
- Eventueel aan te vullen met:
  - SmlgKappa/SmlgLambda indien B-lymfocyten  $>5\%$  van de leukocyten.
  - HLA-DR op CD3+ T cellen ter bepaling van geactiveerde T-cellen.
  - Een combinatie van CD11c, CD16, CD45, CD13.33 ter bepaling van (eosinofiele) granulocyten.
  - CD1a bij vraagstelling histiocytose.

#### 3.3.2 Meten van de celsuspensies op de flowcytometer

- Na de kleuring met monoklonale antistoffen worden de celsuspensies op de flowcytometer gemeten. Gebruik hierbij de voor de instellingen zoals gedefinieerd voor de betreffende flowcytometer.
- Voor een betrouwbare analyse van de lymfocyten(sub)populaties in de BAL-vloeistof dienen tenminste 2000 events binnen een lymfocytengate (gesteld op zijwaartse lichtverstrooiing SSC en CD45 expressie) gemeten te worden.

#### 3.3.3 Beoordeling immunofenotypering

- Analyseer de relatieve omvang van de subpopulaties in BAL en bloed binnen de lymfocytenpopulatie.
- Gebruik de FSC /SSC en CD45/SSC dot plots voor de identificatie van de lymfocytenpopulaties. Maak hierbij gebruik van de volgende eigenschappen: sterke CD45 expressie, lage SSC, lage FSC.
- Analyseer de lymfocytensubpopulatie binnen een gate die op bovengenoemde eigenschappen is vastgesteld.

### 3.4 Bewerking bloed

- Analooq aan de analyse van de BAL-vloeistof wordt bloed geanalyseerd ter vergelijking van de T-cel CD4/CD8 ratio.
- Het immunofenotyperings onderzoek wordt ingezet op vol onbewerkt bloed waarna lysis van de erythrocyten plaatsvindt met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of een commerciële lyseervloeistof.
- Voor het immunofenotyperings onderzoek naar samenstelling en relatieve omvang van lymfocytensubpopulaties kan gebruik gemaakt worden van de volgende MoAb combinaties:
  - Minimaal in te zetten panel:
    - CD3, CD4, CD8 ter bepaling van T-cellen en CD4/CD8 ratio binnen de T-cellen.
- Eventueel aan te vullen met:
  - CD19 ter bepaling van B-lymfocyten en CD56 ter bepaling van NK-lymfocyten.

### Post-analyse

Bij voorkeur integrale rapportage van microscopische analyse en immunofenotyperings onderzoek van BAL én bloed. De rapportage naar de kliniek dient altijd de volgende items te bevatten:

- Celaantal (referentiewaarden)
- Bloedbijmenging
- Rendement
- Celverdeling: lymfocytair, granulocytair (neutrofiel, eosinofiel), monocytair
- Lymfocytensubsets (T, B, NK)
- T-celsubsets en vergelijking CD4/CD8 ratio in het bloed
- CD103 expressie op de CD4 cellen van de BAL
- Resultaten microscopie:
  - epitheel (plaveisel- en/of trilhaarepitheel)
  - (veel) bacteriën
  - asbestlichaampjes
  - insluitsels aanwezig in cellen
  - beoordeling hemosiderine in macrofagen na ijzerkleuring

## 5. Referentiewaarden

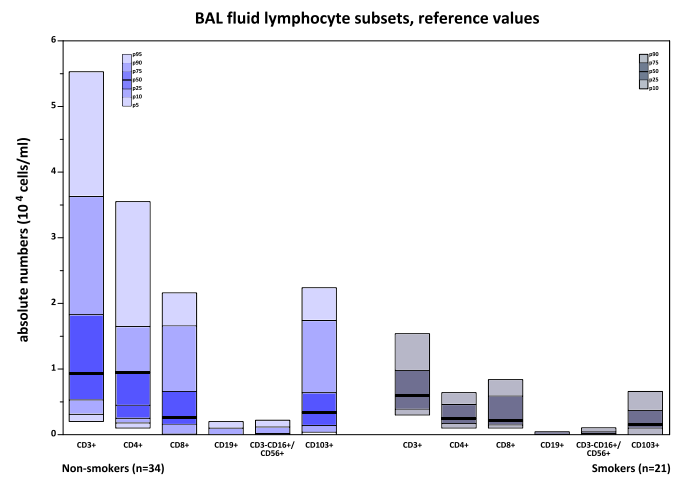
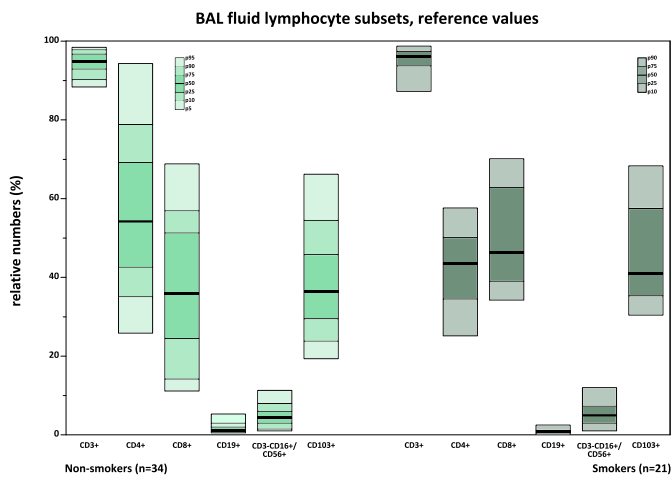
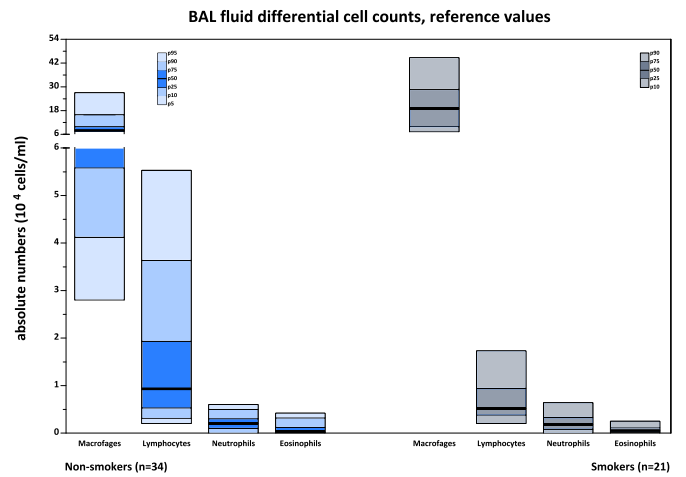
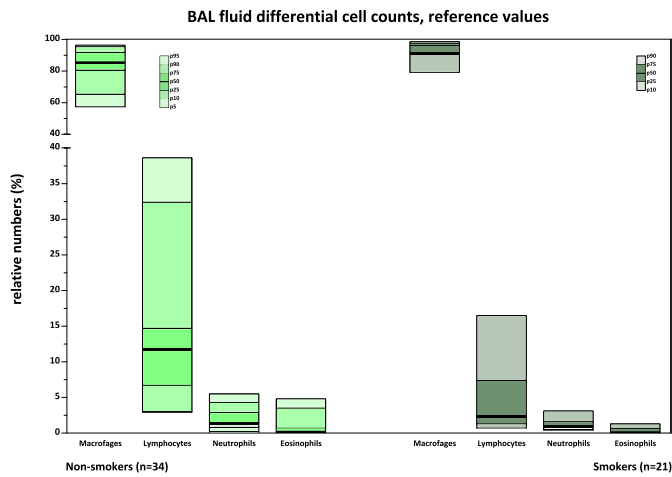
BAL referentiewaarden zijn overgenomen uit:

Heron M, Grutters JC, ten Dam-Molenkamp KM, Hijdra D, van Heugten-Roeling A, Claessen AM, Ruven HJ, van den Bosch JM, van Velzen-Blad H. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clin Exp Immunol.* 2012 Mar;167(3):523-31.

**Table 2.** Differential cell counts and lymphocyte subpopulations in blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in adults (18–64 years).

Non-smokers <i>n</i> = 34	Peripheral blood <sup>1</sup>		Bronchoalveolar lavage		
	# <sup>2</sup>	%	%	# <sup>5</sup>	
Leucocytes	5.6 (3.9–7.3)		58 (46–69)	9.8 (4.7–18.0)	Recovery Cells/ml
Monocytes	0.4 (0.3–0.8)	7.8 (6.2–12.8)	95 (90–98)	7.5 (4.1–15.9)	Vitality Macrophages
Lymphocytes	1.7 (1.3–2.4)	33.9 (23.3–41.5)	85.4 (65.3–95.4)	0.9 (0.3–3.7)	Lymphocytes
Neutrophils	3.0 (2.0–4.7)	54.6 (46.6–62.9)	11.7 (3.0–32.4)	0.2 (0–0.4)	Neutrophils
Eosinophils	0.14 (0.05–0.29)	2.6 (1.1–4.8)	1.3 (0.2–4.3)	0.03 (0.01–0.33)	Eosinophils
Basophils	0.03 (0.02–0.08)	0.6 (0.3–1.8)	0 (0–0.2)	0 (0–0.03)	Basophils
CD3 <sup>+</sup>	1.3 (0.9–2.0)	76 (69–85)	0	0	Plasma cells
CD4 <sup>+</sup>	0.8 (0.6–1.4)	47 (37–61)	95 (90–98)	0.9 (0.3–3.5)	CD3 <sup>+</sup>
CD8 <sup>+</sup>	0.4 (0.2–0.6)	24 (15–35)	54 (35–79)	0.5 (0.2–1.7)	CD4 <sup>+</sup>
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		1.9 (1.2–3.8)	36 (15–57)	0.3 (0.04–1.7)	CD8 <sup>+</sup>
CD19 <sup>+</sup>	0.2 (0.1–0.4)	12 (8–20)	1.5 (0.6–5.5)	0.02 (0.004–0.09)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0.2 (0.1–0.4)	10 (4–17)	2 (0.5–3)	0.04 (0.02–0.15)	CD19 <sup>+</sup>
			5 (2–8)	0.04 (0.02–0.15)	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
			36 (24–55)	0.35 (0.08–1.77)	CD103 <sup>+</sup>
			0.15 (0.05–0.27)		CD103 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
			0.7 (0.3–3.0)		BAL/PB CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
Smokers <i>n</i> = 21	Peripheral blood <sup>1</sup>		Bronchoalveolar lavage		
	# <sup>2</sup>	%	%	# <sup>5</sup>	
Leucocytes	7.1 (4.7–9.0)		55 (37–65)	19.7 (8.1–45.5)	Recovery Cells/ml
Monocytes	0.5 (0.5–0.8)	8.3 (6.2–10.1)	95 (87–98)	19.0 (7.3–44.7)	Vitality Macrophages
Lymphocytes	2.0 (1.5–2.8)	30.9 (20.3–45.9)	96.1 (79.0–98.4)	0.5 (0.2–1.7)	Lymphocytes
Neutrophils	4.1 (2.0–5.8)	60.5 (39.2–69.2)	2.3 (0.7–16.5)	0.2 (0–0.7)	Neutrophils
Eosinophils	0.16 (0.08–0.32)	2.3 (1.2–5.3)	0.9 (0.4–3.1)	0.05 (0–0.25)	Eosinophils
Basophils	0.03 (0.02–0.07)	0.4 (0.3–0.9)	0 (0–0.5)	0 (0–0.07)	Basophils
CD3 <sup>+</sup>	1.5 (1.2–2.1)	77 (66–83)	0	0	Plasma cells
CD4 <sup>+</sup>	1.0 (0.6–1.4)	46 (39–61)	96 (87–99)	0.6 (0.3–1.5)	CD3 <sup>+</sup>
CD8 <sup>+</sup>	0.5 (0.3–0.8)	23 (17–32)	44 (25–58)	0.2 (0.1–0.6)	CD4 <sup>+</sup>
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		1.9 (1.4–3.4)	46 (34–70)	0.2 (0.1–0.9)	CD8 <sup>+</sup>
CD19 <sup>+</sup>	0.3 (0.1–0.4)	13 (7–19)	0.9 (0.4–1.5)	0.005 (0–0.05)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0.2 (0.1–0.4)	8 (4–14)	1 (0.1–2)	0.02 (0.01–0.11)	CD19 <sup>+</sup>
			5 (1–12)	0.02 (0.01–0.11)	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
			41 (30–68)	0.19 (0.04–0.70)	CD103 <sup>+</sup>
			0.19 (0.07–0.41)		CD103 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
			0.4 (0.1–1.3)		BAL/PB CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>

Differential cell counts and lymphocyte subpopulations, and established reference intervals in BAL fluid fraction II. Values are expressed as median (10th–90th percentiles). <sup>1</sup>Reference intervals in peripheral blood did not differ significantly from the established reference intervals used in our hospital [27]; <sup>2</sup> $\times 10^6$  cells/ml. <sup>5</sup> $\times 10^4$  cells/ml.



De BAL-werkgroep anno 2016 bestaat uit de volgende leden:

- Dr. A. Bloem, medisch immunoloog UMCU
- Dr. A.M.E. Claessen, medisch immunoloog St. Antonius ziekenhuis
- Dr. W.A. Dik, medisch immunoloog Erasmus MC
- Dr. M. Heron, medisch immunoloog Elisabeth-Tweesteden ziekenhuis
- Dr. I.M.W. van Hoogstraten, medisch immunoloog VUmc
- Dr. Ir. C.A. Koelman, medisch immunoloog Meander MC
- Dr. B.J. Kroezen, medisch immunoloog UMCG
- Dr. A.J.A. Lambeck, medisch immunoloog UMCG
- Dr. J. Leuvenink, klinisch chemicus Jeroen Bosch ziekenhuis
- Dr. E. van Lochem, medisch immunoloog Rijnstate ziekenhuis
- Dr. Ir. A.H.L. Mulder, klinisch chemicus en medisch immunoloog Medlon

## Addendum BAL consensusprotocol

### Celdifferentiatie

Voor de interpretatie/duiding van de BAL celdifferentiatie resultaten wordt verwezen naar onderstaande richtlijn van de ATS (American Thoracic Society) uit 2012.

‘American Thoracic Society Documents An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease’ (+ online supplement).

Onderstaande tabel is overgenomen uit ATS richtlijn.

**TABLE 1. SUMMARY OF BAL CELLULAR PATTERNS IN NORMAL/HEALTHY ADULT NONSMOKERS AND IN PATIENTS WITH COMMON INTERSTITIAL LUNG DISEASES (CONSISTENT PATTERNS AND CLINICAL UTILITY)**

I. Normal Adults (Nonsmokers)		BAL Differential Cell Counts	
Alveolar macrophages		>85%	
Lymphocytes (CD4+/CD8+ = 0.9–2.5)		10–15%	
Neutrophils		≤3%	
Eosinophils		≤1%	
Squamous epithelia*/ciliated columnar epithelial cells†		≤5%	

II. Interstitial lung diseases			
a. Disorders associated with increased percentage of specific BAL cell types			
Lymphocytic cellular pattern	Eosinophilic cellular pattern	Neutrophilic cellular pattern	
>15% lymphocytes	>1% eosinophils	>3% neutrophils	
Sarcoidosis	Eosinophilic pneumonias	Collagen vascular diseases	
Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP)	Drug-induced pneumonitis	Idiopathic pulmonary fibrosis	
Hypersensitivity pneumonitis	Bone marrow transplant	Aspiration pneumonia	
Drug-induced pneumonitis	Asthma, bronchitis	Infection: bacterial, fungal	
Collagen vascular diseases	Churg-Strauss syndrome	Bronchitis	
Radiation pneumonitis	Allergic bronchopulmonary aspergillosis	Asbestosis	
Cryptogenic organizing pneumonia (COP)	Bacterial, fungal, helminthic, <i>Pneumocystis</i> infection	Acute respiratory distress syndrome (ARDS)	
Lymphoproliferative disorders	Hodgkin's disease	Diffuse alveolar damage (DAD)	

b. Abnormal BAL differential cell patterns that suggest specific types of ILD

A lymphocyte differential count ≥25% suggests granulomatous disease (sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis, or chronic beryllium disease), cellular nonspecific interstitial pneumonia, drug reaction, lymphoid interstitial pneumonia, cryptogenic organizing pneumonia, or lymphoma. CD4+/CD8+ >4 is highly specific for sarcoidosis in the absence of an increased proportion of other inflammatory cell types.

A lymphocyte differential count >50% suggests hypersensitivity pneumonitis or cellular nonspecific interstitial pneumonia.

A neutrophil differential count >50% supports acute lung injury, aspiration pneumonia, or suppurative infection.

An eosinophil differential count >25% is virtually diagnostic of acute or chronic eosinophilic pneumonia.

A cell differential count of >1% mast cells, >50% lymphocytes, and >3% neutrophils is suggestive of acute hypersensitivity pneumonitis.

c. Other abnormal BAL findings

Infectious organism	Lower respiratory infection
Malignant cells (light microscopy, flow cytometry)	Cancer
Bloody fluid that increases in successive aliquots	Pulmonary hemorrhage ± diffuse alveolar damage
Milky fluid with positive periodic acid Schiff staining and amorphous debris	Pulmonary alveolar proteinosis
<i>In vitro</i> lymphocyte proliferative response to specific beryllium antigen	Chronic beryllium disease

Definition of abbreviation: BAL = bronchoalveolar lavage.

\*The presence of squamous epithelial cells indicates upper airway secretion contamination.

† Epithelial cells > 5% suggest suboptimal sample (BAL cellular patterns should be interpreted with caution).

In de Clinical Practice Guideline blijven enkele aspecten onderbelicht onder andere: immuun modulerende medicatie en flowcytometrie (CD103 en NK-cellen). Literatuur onderzoek geeft hieronder samengevat de laatste inzichten.

### Patiënt specifieke factoren

Zoals benoemd in het protocol heeft roken invloed op het aantal cellen in de lavage en de samenstelling hiervan. Wanneer de patiënt immunosuppressieve / immuno-modulerende medicatie gebruikt moet het effect daarvan op de samenstelling van de BAL overwogen worden bij de interpretatie van de resultaten. Omdat de

effecten verschillend kunnen zijn bij verschillende ziektebeelden is niet generiek weer te geven wat verwacht kan worden bij welk middel.

## Flowcytometrie

### CD103

Sinds de publicatie van de door de BAL werkgroep geïnitieerde evaluatie van CD103 als marker voor pulmonale sarcoïdose in 2008, zijn door andere onderzoeksgroepen vergelijkbare analyses gedaan en gepubliceerd (zie voetnoot). Hieruit blijkt een gemengd beeld, enkele bevestigen de waarde van deze marker terwijl in andere publicaties geen onderscheidend vermogen wordt gevonden voor CD103.

### NK cellen

Bij analyse van lymfocyten subsets in de BAL wordt met regelmaat ook een verhoging van het percentage NK cellen gevonden. Dit is niet specifiek voor een bepaald ziektebeeld. In de literatuur zijn verhoogde aantallen NK cellen in BAL beschreven bij hypersensitivity pneumonie, COP, eosinofiele pneumonie, IPF en sarcoïdose.

Meer bronnen ter raadpleging:

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

Selman M, Pardo A, King TE Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Aug 15;186(4):314-24.

Costabel U, Uzaslan E, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in drug-induced lung disease. Clin Chest Med. 2004 Mar;25(1):25-35.

Atlas of Bronchoalveolar Lavage. Ulrich Costabel. Chapman & Hall Medical.

<http://granuloma.homestead.com/>

1988 Costabel The alveolitis of hypersensitivity pneumonitis.

1996 Gruber Determination of gammadelta and other T-lymfocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from patients with sarcoidosis and idiopathic fibrosis of the lung.

2005 Katchar Characterisation of natural killer cells and CD56+Tcells in sarcoidosis patients.

2006 Tutor-Ureta Prognostic value of neutrophils and NK cells in Bronchoalveolar Lavage of Sarcoidosis.

2008 Heron Evaluation of CD103 as cellular marker for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis.

2012 Hyldegaard Value of s-ACE, BAL lymphocytosis, and CD4+CD8+ and CD103+CD4+CD4+ T-cell ratios in diagnosis of sarcoidosis.

2012 Mota Diagnostic value of CD103 expression in BAL in sarcoidosis.

2014 Papakosta Broncho alveolar lavage fluid and blood natural killer and natural killer T-like cells in cryptogenic organizing pneumonia.

2015 Couto Integrin aEb7 (CD103) expression in bronchoalveolar lymphocytes of hypersensitivity pneumonitis.

2015 Tanriverdi Bronchoalveolar Lavage Fluid Characteristics of Patients With Sarcoidosis.

2015 Tanriverdi Comparison of the diagnostic value of different lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid in patients with biopsy proven sarcoidosis.

2016 Bretagne Diagnostic Value of the CD103+CD4+CD4+ Ratio to Differentiate Sarcoidosis from Other Causes of Lymphocytic Alveolitis.

2016 Ridderhof Prognostic Value Of CD4CD8-ratio, CD103+CD4CD4- Ratio, S-ACE And Lymphocytosis In The Diagnosis of Sarcoidosis.

2016 Sidhu BALF CD103+CD4+CD4+ ratio alone is enough to support the diagnosis of sarcoidosis in an appropriate cl