

Beata Chmielowicz¹, Andrzej Obojski¹, Adam Barczyk², Ewa Sozańska², Zdzisława Kycler³, Urszula Demkow⁴, Joanna Domagała-Kulawik⁵

¹Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

²Katedra i Klinika Pneumonologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

³Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej, III Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

⁴Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

⁵Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Współpraca: Beata Brajer (UM Poznań), Joanna Hermanowicz-Salamon (WUM Warszawa), Aleksander Kania (CM UJ Kraków), Marta Maskey-Warzęchowska (WUM Warszawa), Maria Porzezińska (AM Gdańsk), Tadeusz Zielonka (WUM Warszawa)

Redakcja: Joanna Domagała-Kulawik, Przewodnicząca Sekcji BAL PTChP (WUM Warszawa)

Wskazówki metodologiczne Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc odnośnie do wykonywania i oceny plwociny indukowanej

Methodology of induced sputum induction and processing
— recommendation of Polish Respiratory Society

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 378–395

Wprowadzenie

W miarę rozwoju metod diagnostycznych pojawia się potrzeba tworzenia precyzyjnych zasad wykonywania badań. Badania cytologiczne stały się w ciągu ostatnich lat istotnym elementem w diagnostyce wielu chorób układu oddechowego. Szczególne miejsce zajmują badania wymagające oceny ilościowej, do których należy płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL, *bronchoalveolar lavage*) i plwocina indukowana. Obie metody wprowadzone przed około 30 laty zostały szeroko opisane w piśmiennictwie i realizowane są na podstawie różnych protokołów, zarówno w Polsce, jak w ośrodkach zagranicznych. Opracowanie rodzimego dokumentu na temat wskazań metodologicznych badania plwociny indukowanej, podobnie jak innych metod diagnostycznych wymagających standaryzacji, wydaje się w pełni uzasadnione.

We wrześniu 2006 r. została powołana Sekcja BAL Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, której pierwszym i głównym zadaniem było opracowanie ujednoliconych zasad wykonywania badania BAL i plwociny indukowanej. Praca jest wynikiem współpracy wielu specjalistów, którzy zajmują się tymi zagadnieniami, mają w tym zakresie doświadczenie i wyrazili zainteresowanie przygotowaniem opracowania. Autorzy pracują w licznych ośrodkach w Polsce, w większości w ośrodkach akademickich. Dokument został przygotowany przez grupy robocze w kilku oddzielnych częściach. Podział na części wynika ze specyfiki poszczególnych etapów wykonywania badania: pobierania, opracowywania i oceny cytologicznej tego szczególnego materiału, jakim jest plwocina indukowana. Podstawą do tworzenia dokumentu były opracowania metodologiczne zagraniczne i rodzime oraz doświadczenie autorów. Przygotowane opracowanie zostało poddane ocenie przez grono specjalistów — ekspertów w omawianej dziedzinie.

Adres do korespondencji: Joanna Domagała-Kulawik, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1a, 02–097 Warszawa, tel. (022) 599 12 43, e-mail: domagalakulawik@gmail.com

Praca wpłynęła do Redakcji: 19.06.2008 r.

Copyright © 2008 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wskazówki odnośnie opracowania płwociny indukowanej są adresowane do osób pracujących w ośrodkach polskich, gdzie badania te są lub będą wykonywane w celach diagnostycznych, w szczególności do specjalistów chorób płuc, patomorfologów i cytotechników. Forma dokumentu wynika ze specyfiki materiału, który wymaga zarówno oceny jakościowej, jak i ilościowej i powinien być opracowywany w sposób ujednolicony. Brak wytycznych w języku polskim stanowił dotychczas pewne utrudnienie dla wielu osób zajmujących się tego rodzaju badaniami. W opracowaniu wskazówek autorzy starali się zaadaptować dotychczasowe dokumenty zagranicznych specjalistów do warunków polskich.

Joanna Domagała-Kulawik

Wiadomości wstępne

Plwocina indukowana stanowi cenny i łatwy do uzyskania materiał, którego badanie może dostarczyć wielu informacji na temat chorób tocących się w drogach oddechowych. Indukcja płwociny polega na prowokacji odrzutowienia wydzieliny za pomocą inhalacji hiperosmotycznych roztworów chlorku sodu (NaCl). Jest bezpieczną i skuteczną metodą diagnostyczną, szczególnie u chorych, u których kaszel jest nieproduktywny.

Badanie wydzieliny oskrzelowej od ponad 100 lat znajduje zastosowanie w diagnostyce bakteriologicznej i onkologicznej, a ostatnio, dzięki metodzie indukcji, stało się pomocne w ocenie stanu zapalnego dróg oddechowych u pacjentów z astmą oskrzelową, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP), a także innymi chorobami układu oddechowego. Indukcja płwociny umożliwia uzyskanie materiału biologicznego zbliżonego w składzie do płwociny odrzutowionej spontanicznie, zarówno pod względem komórkowym, jak i w zakresie składników pozakomórkowych. Jednak w porównaniu z płwociną otrzymaną spontanicznie, badanie indukowanej płwociny dzięki wprowadzeniu standardów do zabiegu indukcji i opracowania otrzymanego materiału, pozwala na powtarzalną i wiarygodną ocenę składu odsetkowego komórek zapalnych oraz stężeń mediatorów zapalenia i innych substancji w niej zawartych. W płwocinie indukowanej stwierdza się dużą żywotność komórek, co pozwala na „badania przyżyciowe” (stymulację komórek, badanie ich aktywności wydzielniczej, hodowle komórkowe) [1–3]. Indukowana płwocina pochodzi z centralnych części drzewa oskrzelowego, w związku z czym, w przeciwieństwie do płynu z BAL, ma ograniczoną przydatność w oce-

nie chorób tocących się na poziomie pęcherzyków płucnych [4, 5]. Bezpieczeństwo indukcji płwociny, łatwość wykonania oraz stosunkowo duża powtarzalność i wiarygodność wyników stanowią o atrakcyjności tej metody diagnostycznej.

Wskazania do indukcji płwociny [5]

Diagnostyka chorób płuc:

- astma oskrzelowa — dominującymi komórkami są eozynofile uwalniające takie mediatory, jak: eozynofilowe białko kationowe (ECP), neurotoksyna eozynofilowa (EDN), peroksydaza eozynofilowa (EDP); w ciężkiej astmie i zaostreniu astmy często obserwuje się napływ neutrofilów;
- POChP — typowymi komórkami są neutrofile. W nadsączu przeważają interleukina-8 (IL-8), mieloperoksydaza (MPO), ludzka lipokaina neutrofilowa (NHL); w przypadku astmy i POChP badanie płwociny indukowanej może mieć znaczenie w diagnostyce różnicowej trudnych przypadków tych chorób;
- przewlekły kaszel — w diagnostyce różnicowej kaszlu badanie płwociny jest obecnie rekomendowane, umożliwia m.in. rozpoznanie eozynofilowego zapalenia oskrzeli czy choroby refluksowej (dodatkowo barwienie makrofagów na tłuszcze);
- mukowiscydoza — typowa jest bogatokomórkowa płwocina, z dominacją neutrofilów;
- diagnostyka mikrobiologiczna — płwocina indukowana znajduje zastosowanie w różnicowaniu zakażeń, głównie oportunistycznych, w szczególności w przypadku podejrzenia infekcji *Pneumocystis jiroveci* i *Mycobacterium tuberculosis* (jakkolwiek w niektórych ośrodkach badanie w kierunku gruźlicy budzi zastrzeżenia) [6];
- pylice i narażenie na pyły — obecność cząstek pyłów i substancji wdychanych wolnych i wiązanych w cytoplazmie makrofagów ułatwia rozpoznawanie pylic [6];
- sarkoidoza i inne choroby śródmiąższowe — według niektórych autorów skład komórkowy indukowanej płwociny może być równie przydatny w diagnostyce tych chorób jak płyn z BAL (co wymaga dalszych badań), jednak w płwocinie, której skład odzwierciedla procesy chorobowe toczące się w centralnych drogach oddechowych, występuje większy odsetek neutrofilów i eozynofilów, natomiast mniejszy odsetek makrofagów i limfocytów — przy porównywalnym profilu subpopulacji limfocytów uzyskanych w BAL [6, 7];

- rak płuca — podobnie jak w przypadku płwociny spontanicznej, jedynie w guzach wewnątrzoskrzelowych płwocina indukowana może mieć pewne znaczenie w rozpoznawaniu nowotworu. Zastosowanie badań molekularnych może umożliwić wykrycie wczesnych zmian wyprzedzających rozwój raka, szczególnie u osób z grup ryzyka;
- inne, rzadziej spotykane choroby, takie jak aspergiloza oskrzelowo-płucna, choroba Fabry’ego, zmiany polekowe.

Ocena odpowiedzi na leczenie i ekspozycję alergenową:

- utrzymywanie się eozynofilii w płwocinie indukowanej u pacjentów z rozpoznaną astmą oskrzelową po zastosowaniu steroidów wziewnych może wskazywać na nieadekwatne leczenie (zbyt mała dawka, niepełna współpraca z chorym, oporność na glikokortykosteroidy) [4];
- zwiększenie odsetka eozynofilów po ekspozycji na alergen potwierdza znaczenie tych komórek w patogeniezie astmy u badanego chorego;
- zwiększenie odsetka eozynofilów u chorego na POChP może wskazywać na zasadność zastosowania glikokortykosteroidów.

W aktualnych badaniach wykazano przydatność indukcji płwociny jako metody pozwalającej na pozyskanie materiału z dróg oddechowych u dzieci mających trudności w spontanicznym odkrztuszeniu płwociny. Znajduje ona zastosowanie również w diagnostyce i monitorowaniu astmy oskrzelowej [8, 9], mukowiscydozy [10–12], refluksu żołądkowo-przelykowego i przewlekłego kaszlu [13], rozstrzeni oskrzeli [14], eozynofilowego zapalenia oskrzeli [15], obturacyjnego bezdechu sennego [16], pierwotnej dyskinezji rzęsek [17], a także w diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń dolnych dróg oddechowych [18, 19] i aspergilozy oskrzelowo-płucnej [20]. Podobnie jak u chorych dorosłych, badanie wykorzystuje się w ocenie odpowiedzi na zastosowane leczenie [21] oraz ekspozycję na czynniki szkodliwe i alergeny.

Przeciwwskazania do indukcji płwociny (podobnie jak w innych dooskrzelowych próbach prowokacyjnych)

Przeciwwskazania bezwzględne [22–24]:

- brak zgody chorego na indukcję płwociny,
- źle kontrolowana ciężka astma oskrzelowa, z $FEV_1 < 1,0$ litra lub 50% wartości należnej, astma w okresie zaostrzenia,
- zaostrzenie POChP,

- ostry incydent wieńcowy lub udar mózgu w ciągu ostatnich 3 miesięcy,
- źle kontrolowane nadciśnienie tętnicze (ciśnienie skurczowe > 160 mm Hg lub ciśnienie rozkurczowe > 95 mm Hg),
- saturacja krwi $< 90\%$, mimo zastosowania optymalnej biernej tlenoterapii,
- tętniak aorty piersiowej i brzusznej, tętniak naczyń mózgowych,
- brak możliwości monitorowania przebiegu indukcji płwociny badaniem spirometrycznym,
- ciąża,
- niewymienione powyżej przeciwwskazania do wykonywania spirometrii, tj. operacja okulistyczna wykonana w ostatnim okresie, zwiększone ciśnienie śródgałkowe, krwiopłucie o niejasnej etiologii, odma opłucnowa.

Przeciwwskazania względne [22–24]:

- astma oskrzelowa niedostatecznie kontrolowana, z FEV_1 pomiędzy 1,0 i 1,5 litra lub 50–70% wartości należnej (indukcja płwociny jest zazwyczaj bezpieczna, gdy $FEV_1 > 1,5$ litra i 70% wartości należnej),
- ciężka i bardzo ciężka POChP (stopień III i IV wg GOLD),
- przeciwwskazania względne do wykonania spirometrii, tj. trudności w prawidłowym wykonaniu spirometrii, np. ból po operacji w obrębie jamy brzusznej lub klatki piersiowej, zawroty głowy, zaburzenia rytmu serca, upośledzenie umysłowe, zaburzenia psychiczne.

Przeciwwskazania do indukcji płwociny wymieniane dla pacjentów dorosłych obowiązują również pacjentów pediatrycznych. Podkreślić należy, że z uwagi na konieczność współpracy podczas inhalacji stężonych roztworów NaCl i umiejętność odkrztuszania płwociny (najmłodsze dzieci płwocinę połykają) oraz zapewnienia monitorowania tej procedury badaniem spirometrycznym, indukcję płwociny można przeprowadzać u dzieci powyżej 6. rż.

Wykonywanie indukcji płwociny

Indukcja płwociny jest próbą prowokacyjną, której może towarzyszyć wystąpienie skurczu oskrzeli, szczególnie u osób z dużą nadreaktywnością oskrzeli. W czasie jej przeprowadzenia konieczna jest obecność lekarza i zabezpieczenie w sprzęt do udzielania pomocy medycznej. Należy zapewnić dostęp do leków rozszerzających oskrzela (salbutamol, bromek ipratropium), adrenaliny, tlenu, aparatu do mierzenia ciśnienia tętniczego,

spirometru oraz pulsoksymetru. Przy wysokim ryzyku wystąpienia reakcji niepożądanych chory powinien mieć założony dostęp dożylny (wenflon). Wskazane jest wykonywanie indukcji w oddzielnym pomieszczeniu, spełniającym wymogi gabinetu zabiegowego. Badanie spirometryczne powinno spełniać kryteria poprawności ustalone przez Polskie Towarzystwo Chorób Płuc (PTChP) [24].

Obecnie dostępnych jest kilka protokołów indukcji płwociny, różniących się przede wszystkim stężeniami stosowanych roztworów NaCl [1]. Wspólnymi cechami wszystkich protokołów są:

- premedykacja przed rozpoczęciem indukcji przy użyciu bronchodylatora (salbutamol MDI 200–400 μ g podany przez przystawkę objętościową lub salbutamol w nebulizacji 2,5 mg),
- odnoszenie kontrolnych spirometrii wykonywanych pomiędzy kolejnymi cyklami indukcji płwociny do wyjściowego badania wentylacji płuc po leku rozszerzającym oskrzela,
- kryteria przerywania procedury ze względów bezpieczeństwa chorego.

Zwykle zaleca się przeprowadzanie indukcji w 3 cyklach trwających, zależnie od protokołu, 5–7 min. Po każdym cyklu zachęca się pacjenta do wykrztuszenia wydzieliny z drzewa oskrzelowego oraz wykonuje się badanie spirometryczne. Spadek $FEV_1 > 20\%$ w stosunku do wartości wyjściowej FEV_1 (uzyskanej w 15 min po przyjęciu bronchodylatora) jest wskazaniem do zakończenia procedury ze względów bezpieczeństwa. Indukcję płwociny można prowadzić:

- solą fizjologiczną, zwłaszcza u chorych z dużym ryzykiem skurczu oskrzeli,
- stałym stężeniem roztworu NaCl (3%),
- wzrastającymi z każdym cyklem stężeniami NaCl (3%–4%–5%).

W Załączniku 2. przedstawiono schemat metod indukcji i proponowany protokół badania.

Warunkiem zwiększenia stężenia NaCl jest brak spadku FEV_1 przekraczającego 10% wyjściowej wartości FEV_1 po salbutamolu. Przy zmniejszeniu $FEV_1 > 10\%$ a $< 20\%$ wartości wyjściowej należy powtórzyć inhalację poprzednim stężeniem roztworu NaCl.

W większości prac dotyczących przeprowadzania indukcji płwociny u dzieci chorych na astmę w protokole był ujęty krótkodziałający β_2 -mimetyk (salbutamol), zwykle w dawce 200 μ g. Obserwowane średnie spadki FEV_1 nie przekraczały 10–15% [25–28]. Zastosowanie u dzieci salbutamolu w postaci aerozolu wymaga bezwzględnie użycia „spejsera”.

W czasie indukcji płwociny zaleca się ciągły pomiar saturacji krwi za pomocą pulsoksymetru oraz kontrolę częstości pracy serca. U chorych z sa-

turacją krwi $< 90\%$ należy prowadzić bierną tlenoterapię w celu uzyskania wartości saturacji $\geq 90\%$.

Wskazania do przerywania indukcji płwociny:

- spadek $FEV_1 \geq 20\%$ wartości wyjściowej (po salbutamolu),
- spadek saturacji krwi $< 90\%$,
- tachykardia $> 120/\text{min}$,
- wzrost ciśnienia tętniczego $> 160/95$ mm Hg,
- wystąpienie istotnych hemodynamicznie zaburzeń rytmu serca,
- wystąpienie innych istotnych klinicznie objawów niepożądanych, np. bólu dławicowego,
- brak zgody pacjenta na kontynuację badania.

Ponowną indukcję płwociny, jeśli są takie wskazania, powinno się wykonać po przerwie, która wynosi minimum 48 godz.

Wskazania do przerywania indukcji płwociny **u dzieci** nie odbiegają od tych dotyczących dorosłych. Pomiary FEV_1 powinny być prowadzone w odstępach nie dłuższych niż 5 min, a obserwowane spadki FEV_1 nie powinny być większe niż 10% w stosunku do wartości uzyskanych po salbutamolu. W przypadku spadku FEV_1 w zakresie 10–20% możliwa jest kontynuacja badania, ale z użyciem aktualnie stosowanego stężenia NaCl. Większe spadki wartości FEV_1 (co najmniej 20%) lub wystąpienie objawów klinicznych obturacji dróg oddechowych są wskazaniem do przerywania badania i podania leku rozszerzającego oskrzela. Ponieważ monitorowanie wydolności oddechowej podczas indukcji płwociny odbywa się za pomocą badań spirometrycznych, należy zwrócić uwagę na fakt, że do indukcji płwociny powinny być kwalifikowane tylko te dzieci, które wykonują poprawnie i powtarzalnie badanie spirometryczne.

Opracowanie materiału i przygotowanie preparatów

Wprowadzenie

Metodę indukowanej płwociny do badań stanu zapalnego dróg oddechowych w chorobach, takich jak astma oskrzelowa i POChP zastosowano stosunkowo niedawno, bo na początku lat 90. ubiegłego wieku. Od pierwszych lat pojawiły się dwie główne metody postępowania z wyindukowaną płwociną w laboratorium [29]. Zanim podjęto próby standaryzacji obu tych sposobów, podlegały one wielu drobnym modyfikacjom dokonywanym w ośrodkach wykorzystujących to badanie. Najważniejszym czynnikiem różnicującym obie metody jest oddzielanie lub nieoddzielanie płwociny od śliny.

W historycznie najstarszej metodzie grudki płwociny oddzielane są od reszty odkrztuszonego materiału makroskopowo lub przy zastosowaniu mikroskopu z odwróconą optyką [30].

Zaletą tej metody jest uzyskanie materiału, który pochodzi w większości z dolnych dróg oddechowych, w związku z tym odsetek komórek nabłonkowych jest niski, jakość preparatów cytologicznych wysoka, a stężenia białek i innych związków chemicznych w płwocinie są wyższe niż w drugiej metodzie. Natomiast wadami — pracochłonność, konieczność stosowania mikroskopu z odwróconą optyką, a także utrata części materiału z dolnych dróg oddechowych związana z arbitralnością rozróżnienia „śliny” od „płwociny” oraz trudności techniczne w idealnym oddzieleniu obu tych części od siebie.

W drugiej metodzie opracowaniu podlega cały odkrztuszony materiał, będący mieszaniną śliny i płwociny [31].

Zaletą jest szybkość i prostota, badanie może być wykonane przez osobę nawet z małym doświadczeniem, wadą — mniejsza wiarygodność wyników związana z domieszką śliny, która w niektórych przypadkach może dominować w odkrztuszonym materiale, w związku z czym odsetek komórek nabłonkowych jest wyższy, a powtarzalność wyników gorsza [32].

W Załączniku 3. przedstawiono oba sposoby opracowania płwociny indukowanej.

Postępowanie wstępne

Odkrztuszoną płwocinę należy dostarczyć do laboratorium w zamkniętym i dokładnie opisanym naczyniu (imię i nazwisko badanego, data i godzina zakończenia indukcji), najlepiej, o ile jest to możliwe, w pojemniku z lodem. Zaleca się przystępowanie do opracowania jak najszybciej, najlepiej do 2 godz., a najpóźniej, przechowując materiał w lodówce, do 9 godz. od zakończenia indukcji [33]. Płwocinę należy przełożyć na płytkę Petriego (umieszczoną na ciemnym tle) w celu przeprowadzenia oceny makroskopowej. Odkrztuszony materiał może mieć postać wydzieliny śluzowej, ropnej lub śluzowo-ropnej. Płwocina, to zazwyczaj gęste, lepkie i w różnym stopniu skondensowane fragmenty w formie białawych lub szarych pasemek i grudek, które są zawieszone w mieszaninie śliny i śluzu. Dalsze postępowanie może przebiegać albo z izolacją fragmentów i grudek płwociny z całego odkrztuszonego materiału [34–37], czyli wyodrębnieniem za pomocą tępych kleszczyków, często pod kontrolą mikroskopu, albo też z pominięciem tego etapu. W tym drugim przypadku, dalszej obróbce podlega cały odkrztuszony materiał [31]. W pierwszym przypadku prawidłową jakością badania zapewnia uzyskanie do dalszej obróbki ok. 50 g materiału, w drugim — ok. 2 ml.

Homogenizacja płwociny

Badany materiał (cała wydzielina lub oddzielona płwocina) jest ważony, a następnie podlega homogenizacji przy pomocy 0,1% roztworu dithiothreitolu (DTT). Homogenizację płwociny przeprowadza się kolejno poprzez aspirację pipetą, delikatne wytrząsanie i na koniec kołysanie (mieszanie) przez 15 min na kołysce laboratoryjnej. Najczęściej używanym odczynnikiem do homogenizacji płwociny jest roztwór DTT o nazwie sputolizyna (firmy Calbiochem) lub DTT w postaci proszku do wykonania 0,1% roztworu w wodzie destylowanej na bieżąco (tuż przed homogenizacją).

W przypadku zastosowania metody oddzielania płwociny od śliny, do zważonej, oddzielonej płwociny należy dodać 0,1% roztwór DTT o objętości równej 4-krotnej wadze płwociny (np. do płwociny o wadze 1 g dodaje się 4 ml 0,1% roztworu DTT).

Jeżeli opracowaniu podlega cały odkrztuszony materiał, objętość roztworu DTT powinna zależeć od stosunku płwociny do śliny w badanej wydzielinie. Ponieważ stosunek ten jest nieznan, objętość 0,1% roztworu DTT równa się objętości badanej wydzieliny [31, 32, 38].

Zalecaną temperaturą opracowania płwociny jest temperatura pokojowa (ok. 22°C).

Filtrowanie homogenatu płwociny indukowanej

W celu usunięcia resztek śluzu, uszkodzonych komórek i zanieczyszczeń zaleca się przefiltrowanie homogenatu płwociny przez filtr nylonowy. W piśmiennictwie najczęściej zaleca się gazę nylonową (48–52 μm) (np. firmy BNSH Thompson). Filtrowanie homogenatu płwociny powoduje niewielkie obniżenie całkowitej liczby komórek, jednak nie ma to wpływu na skład odsetkowy komórek.

Wyliczanie całkowitej liczby i żywotności komórek w wyindukowanej płwocinie

Po przefiltrowaniu, homogenat płwociny należy zmieszać poprzez aspirację pipetą, a następnie wyliczyć całkowitą liczbę komórek nienabłonkowych, odsetek komórek nabłonkowych oraz żywotność komórek nienabłonkowych. Powyższe obliczenia przeprowadza się w komorze hematologicznej Neubauera lub Bürkera [4, 32, 36]. Całkowita liczba komórek powszechnie jest wyrażana jako liczba komórek $\times 10^6$ w przeliczeniu na 1 g lub 1 ml wyindukowanej płwociny. Żywotność komórek, wyrażana w odsetkach, jest określana przy użyciu błękitu trypanu — odczynnika, który wybarwia na kolor niebieski martwe komórki (*trypan blue exclusion method*).

Zaleca się, aby wyliczanie całkowitej liczby komórek zapalnych w płwocinie dokonywać przed odwirowaniem homogenatu płwociny. Wirowanie powoduje spadek ich liczby, chociaż nie zmienia składu odsetkowego typów komórek [32]. Żywotność komórek płwociny selekcionowanej, podlegającej natychmiastowej obróbce i homogenizowanej za pomocą DTT jest duża i wynosi około 80% [39–41]. Żywotność komórek poniżej 50% świadczy o niskiej jakości materiału [42].

Oddzielanie komórek płwociny od fazy płynnej

Kolejnym etapem postępowania ze zhomogenizowaną i przefiltrowaną płwociną indukowaną jest oddzielanie fazy komórkowej od fazy płynnej poprzez odwirowanie materiału w wirówce laboratoryjnej. Zaleca się 10 min wirowania przy sile $300\text{--}400 \times g$ [1, 32]. Supernatant należy ostrożnie oddzielić od pozostającego na dnie próbówki wirówkowej osadu komórek, następnie porcjować go do próbek typu *eppendorf*, opisać i przechowywać w zamrażarce do czasu wykonania badań biochemicznych w przedziale temperatur od -20°C do -70°C .

Badania dotyczące czasu oraz optymalnej temperatury przechowywania supernatantu z uwzględnieniem poszczególnych białek zapalnych są do tej pory niewystarczające [3].

Wykonywanie preparatów cytologicznych

Preparaty cytologiczne można wykonywać metodą tradycyjną, rozprawdzając ręcznie zawiesinę komórkową na podstawowych szkiełkach mikroskopowych. Zalecanym standardem jest wykonywanie ich za pomocą cytowirówki. W tym celu otrzymany po wirowaniu osad komórek, o znanej liczbie całkowitej, należy zawiesić w takiej objętości roztworu PBS (lub DPBS), aby liczba komórek mieściła się w granicach $40\text{--}60 \times 10^5/\text{ml}$. Optymalnymi warunkami wirowania są: objętość wirowanej zawiesiny — $100 \mu\text{l}$, siła odśrodkowa wirowania — $22 \times g$ ($10\text{--}51 \times g$), czas wirowania — 6 min. Większe przyspieszenia mogą powodować uszkodzenia komórek, natomiast zbyt małe — utratę limfocytów [43]. W badaniach porównawczych wykazano wyższość techniki cytospinowej nad manualną. Pozwala ona na uzyskiwanie reprezentatywnych ilościowo i jakościowo preparatów, które w porównaniu z preparatami wykonywanymi ręcznie charakteryzują się znacząco wyższą powtarzalnością wyników, a ograniczone pole osadzonych na szkiełku mikroskopowym komórek znacznie skraca czas oceny cytologicznej [4, 34]. Z kolei preparaty wykonane manualnie pozwalają

na zachowanie wszystkich komórek, co może mieć znaczenie w diagnostyce onkologicznej. Można uznać, że ręczne wykonanie rozmazów jest dopuszczalne w laboratoriach niedysponujących cytowirówką, pod warunkiem, że jakość tych preparatów pozwala na interpretację zgodną ze standardami.

Wskazane jest uzyskanie co najmniej 3 preparatów do oceny rutynowej i co najmniej 2 w celu zabezpieczenia do badań dodatkowych. Optymalnie należy wykonać:

- a) 2 preparaty wysuszone do barwienia hematologicznego metodą May-Grünwalda/Giemsa (MGG),
 - b) 2 preparaty utrwalone w alkoholu lub utrwalczu alkoholowym (np. Cytotfix),
 - c) 2–4 preparaty wysuszone i natychmiast po wysuszeniu umieszczone w temperaturze -20°C .
- Ad. a) Preparaty cytologiczne wysuszone na powietrzu są wybarwiane metodą MGG. Jest to metoda barwienia z wyboru. W trakcie wybarwiania należy przestrzegać wszystkich zaleceń producenta odczynników odnośnie ich przygotowania, zachowania odpowiedniego pH oraz czasu wybarwiania na poszczególnych etapach barwienia. Inne metody barwienia, np. barwienie w kierunku komórek metachromatycznych za pomocą błękitu toluidyny, umożliwiają identyfikację komórek tucznych oraz bazofilów [4, 29, 31, 34, 44].
- Ad. b) Preparaty utrwalone w alkoholu są wybarwiane hematoksyliną-eozyną.
- Ad. c) Zamrożone preparaty mogą być wykorzystane do przeprowadzenia barwień immunocytochemicznych, w zależności od wskazań klinicznych. Czas przechowywania nie został określony.

Modyfikacje metodologii opracowywania indukowanej płwociny

Modyfikacje metody opracowywania płwociny zmierzają z jednej strony do jej uproszczenia tak, aby mogła być powszechnie stosowana w praktyce klinicznej [30, 33, 45–49]. Z drugiej strony, w celu uzyskania materiałów o wyższej jakości i ich aplikacji do takich technik, jak cytometria przepływowa, reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*), hybrydyzacja *in situ* lub immunocytochemia metodyka staje się bardziej złożona [49–52]. Jako przykłady mogą posłużyć badania Ronchi i wsp. [50], którzy oczyszczali zawiesinę komórek płwociny z pozostałości śluzu, zanieczyszczeń oraz resztek martwych ko-

mórek. Dokonywali tego poprzez kilkukrotne filtrowanie zawiesiny komórkowej, wirowanie w gradiencie Percollu, płukanie w medium użytym do hodowli komórkowych. Dzięki temu otrzymywali preparaty cytospinowe, których jakość umożliwiła zastosowanie techniki immunocytochemicznej oraz hybrydyzacji *in situ*. Pomimo że metoda powoduje obniżenie całkowitej liczby komórek, nie wpływa jednak na ich skład odsetkowy w płwocinie. Z kolei Mamessier i wsp. [52] opracowali szczegółowy protokół ekstrakcji RNA z małych próbek zawierających zaledwie 100 tys. komórek izolowanych z płwociny indukowanej.

W supernatancie z płwociny za pomocą metod immunoenzymatycznych (EIA) i radioimmunoenzymatycznych (RIA) mogą być mierzone stężenia różnych białek, takich jak cytokiny, rozpuszczone cząsteczki adhezyjne, markery przesieku naczyniowego (np. albumina, fibrynogen) oraz markery aktywacji granulocytów [3, 30, 51, 53–57]. Celem licznych prac metodologicznych było również przystosowanie technik opracowania płwociny do uzyskania powtarzalnych wyników tych oznaczeń. Nadal jednak oznaczanie stężeń substancji rozpuszczalnych ma raczej znaczenie poznawcze niż diagnostyczne.

Opisano różne sposoby mające na celu umożliwienie przesunięcia opracowania materiału w czasie. Na przykład Kelly i wsp. [45] zastosowali paraformaldehyd, który działa stabilizująco na błony komórkowe oraz szybko utrwala wiązania krzyżowe w strukturze śluzu w płwocinie. Pozwala to na bezpieczny transport próbek nawet do oddalonych laboratoriów. Komórki płwociny na drodze trypsynizacji można następnie uwolnić i w ten sposób opóźnić opracowanie płwociny nawet o kilkadziesiąt godzin. Z kolei Prince i wsp. [58] opisali procedurę zabezpieczania komórek płwociny za pomocą bydlęcej surowicy płodowej (FBS, *fetal bovine serum*) poprawiającej przeżywalność komórek w warunkach *in vitro*. Z kolei dodatek odczynnika DMSO (*dimethyl sulfoxide*) pozwala na bezpieczne zamrożenie materiału komórkowego do temperatury -80°C . Po rozmrożeniu komórki nadal zachowują swoje właściwości, a przede wszystkim żywotność. Praktycznym środkiem stosowanym do zachowania płwociny jest roztwór Saccomanno dostępny jako standardowy odczynnik (*polyethylene glycol solution*, Fluka). Jego zaletą jest zachowanie morfologii komórek. Roztwór znajduje zastosowanie jako odczynnik zabezpieczający na czas transportu do laboratorium.

Ocena cytologiczna

Przedmiotem badania cytologicznego płwociny indukowanej jest ocena jakościowa morfologii komórek oraz ocena ilościowa składu odsetkowego komórek.

Typowymi składnikami komórkowymi płwociny indukowanej są komórki nabłonka płaskiego, makrofagi, limfocyty oraz granulocyty obojętnochłonne i kwasochłonne. Dodatkowo można stwierdzić obecność innych komórek: atypowych, nowotworowych oraz licznych rodzajów drobnoustrojów, zaś komórki nienabłonkowe mogą mieć zmienione formy (szczególnie dotyczy to makrofagów). Preparaty cytologiczne powinien oceniać wykwalifikowany cytotechnik, a wynik weryfikować i podpisywać patomorfolog. Badanie płwociny indukowanej jest specjalistycznym badaniem cytologicznym i powinno być wykonywane w pracowniach cytologii.

Niniejsze wytyczne dotyczą oceny płwociny indukowanej jako materiału znajdującego zastosowanie w diagnostyce chorób płuc. Obecnie w większości pracowni wykonuje się to badanie jedynie w celach badawczych, dla których materiał ten okazał się niezwykle cenny. Jednak należy pamiętać, że jest to materiał pobrany od chorego i znalezienie w trakcie badania naukowego jakichkolwiek nieprawidłowości powinno być zweryfikowane, odnotowane i przekazane klinicyście — osobie kierującej na badanie. Zaleca się opracowanie wyniku i opisanie w każdym przypadku (proponycja wzoru wyniku w załączeniu). Jak w każdym przypadku badania cytologicznego, wynik wydaje się jak najszybciej po dokonaniu jego oceny, w ciągu 1–2 dni.

Ocena preparatów

Odpowiednio przygotowane, utrwalone i zabarwione preparaty wymagają standardowego badania, w powiększeniach 100 i 200 $\times$. W czasie wstępnej oceny należy ustalić, czy preparat jest wartościowy. Do preparatów, które nie mają właściwej jakości, należy podejść z dużą ostrożnością i zaleca się uznanie ich jako niediagnostycznych. Unika się w ten sposób wielu pomyłek zarówno w kierunku rozpoznać fałszywie dodatnich, jak i ujemnych. W czasie wstępnej oceny całego preparatu należy określić dominującą populację komórek oraz ewentualnie rozpoznać obecność innych elementów niż podstawowe typy komórek.

Ocena ilościowa wymaga dokładnej identyfikacji komórek, co jest możliwe w barwieniu hematologicznym MGG, w dużym powiększeniu 1000 $\times$ z zastosowaniem immersji. Pierwszym etapem oceny ilościowej jest policzenie odsetka komórek nabłonka płaskiego. Obecność poniżej 50% tych

komórek oraz obecność co najmniej 200 komórek nienabłonkowych pozwala uznać rozmaz jako wartościowy do dalszej oceny [59]. Dane z piśmiennictwa są bardzo rozbieżne, od 20% do 80% komórek nabłonka płaskiego, co jest zdecydowanie zbyt dużą wartością.

Na kolejnym etapie dokonuje się obliczenia odsetka komórek nienabłonkowych: makrofagów, limfocytów, granulocytów obojętnochłonnych i granulocytów kwasochłonnych (tak też należy podać wynik: jako odsetek wszystkich komórek niebędących komórkami nabłonka płaskiego). Praktycznie należy wybrać kilka przypadkowych pól i policzyć łącznie 300 komórek, aby obiektywnie ocenić ich wzór odsetkowy. W trakcie analizy ilościowej najlepiej brać pod uwagę komórki „pewne”, takie, które można odpowiednio zakwalifikować, niebudzące wątpliwości, o dobrze zachowanej morfologii. Nie należy analizować pól niekwalifikujących się do oceny (np. komórki w grupach, zlepione, o zatartych granicach). Trudności interpretacyjne opisano uprzednio [60].

Istotnym wskazaniem klinicznym do badania płwociny indukowanej jest diagnostyka mikrobiologiczna. W rutynowo barwionych preparatach można stwierdzić obecność lub pośrednie cechy obecności drobnoustrojów, takich jak grzyby, cechy zakażenia niektórymi wirusami (HPV, CMV), pośrednie cechy obecności *P. jiroveci*. Dokładna diagnostyka mikrobiologiczna (zgodnie z zasadami wykonania posiewów i barwień mikrobiologicznych) powinna być wykonana na wyraźne zlecenie klinicysty. Jeżeli drobnoustroje zostaną wykryte przypadkowo, należy wykonać dodatkowe barwienia na utrwalonych preparatach zachowanych do dalszych badań lub zalecić dalszą diagnostykę, np. ponowne pobranie materiału.

W części „Opracowanie materiału i przygotowanie preparatów” opisano metodę przechowywania preparatów, które mogą służyć do badań immunocytochemicznych. Wykonanie badania i interpretacja wyników badań immunocytochemicznych w przypadku płwociny indukowanej powinny być zgodne ze standardami wykonania tych badań w diagnostyce patomorfologicznej.

Wynik badania

Wzór wyniku przedstawiono w Załączniku 4. W tabeli 1 podano wyniki badania płwociny indukowanej u osób zdrowych, palących i niepalących [41, 61–64]. Widoczne są pewne rozbieżności, zwłaszcza szerokie zakresy odsetka komórek, co wynika z charakteru i pochodzenia materiału ze znacznego obszaru dróg oddechowych. Zdaniem autorów nie jest możliwe ustalenie tak dokładnych norm dla płwociny indukowanej, jak dla płynu

z BAL, stąd we wzorze wyniku podano jedynie zakres norm składu komórkowego dla osób zdrowych niepalących. Nawet w warunkach zdrowia na skład płwociny indukowanej wpływa wiele czynników (patrz część „Czynniki wpływające na skład indukowanej płwociny”). Szczególny wpływ na zmianę składu komórkowego wydzielin oskrzelowych ma palenie papierosów, dlatego w trakcie interpretacji badania mikroskopowego należy zawsze brać pod uwagę dokładny wywiad dotyczący tego nałogu.

Czynniki wpływające na skład indukowanej płwociny

Premedykacja salbutamolem [1, 2, 35]:

- zmniejsza stężenie histaminy w nadsączu uzyskanym z płwociny, ale nie wpływa na skład komórkowy i cytokinowy materiału.

Zastosowanie różnych stężeń roztworów chlorku sodu (wpływ osmolarności roztworów):

- osmolarność roztworu NaCl nie wpływa na liczbę i skład odsetkowy komórek oraz stężenie substancji pozakomórkowych [1, 65, 66],
- hipertoniczne roztwory NaCl zwiększają osmolarność i stężenie jonów sodu w wyindukowanej płwocinie.

Czas trwania indukcji płwociny:

- w płwocinie uzyskanej w początkowych etapach (po pierwszym cyklu indukcji) obserwuje się większą liczbę neutrofilów i eozynofiliów oraz uwalnianych przez nie mediatorów (IL-8, ECP), podczas gdy w końcowej fazie indukcji (po cyklu 3.) stwierdza się większą liczbę limfocytów i makrofagów [1, 67]; sugeruje to, że wydzielina odkrztuszona po kilkunastu minutach indukcji pochodzi z bardziej obwodowych obszarów drzewa oskrzelowego, a zatem jest zbliżona składem do płynu z BAL [67],
- za mniejsze stężenie IL-8 i ECP w próbkach wydzieliny oskrzelowej odkrztuszonej w dalszych etapach indukcji płwociny może odpowiadać rozcieńczenie próbki płwociny związane z inhalacją roztworów chlorku sodu [67].

Rodzaj nebulizatora użytego do indukcji płwociny:

- znaczenie rodzaju nebulizatora dla składu wyindukowanej płwociny nie jest w pełni ustalone; większość danych przemawia za uzyskiwaniem porównywalnej w składzie wydzieliny oskrzelowej przy użyciu nebulizato-

Tabela 1. Wartości liczby i odsetka komórek w płwocinie indukowanej od osób zdrowych z uwzględnieniem podziału na osoby palące papierosy i osoby niepalące
Table 1. Total and differential cell count in the induced sputum of healthy persons in relation to smoking habit

	Domagała i wsp. [63] <i>Domagała et al. [63]</i>		Belda i wsp. [62] <i>Belda et al. [62]</i>		Sozańska i wsp. [41] <i>Sozańska et al. [41]</i>	
	Palący <i>Smokers</i>		Niepalący <i>Nonsmokers</i>		Wszyscy badani <i>Total</i>	
	N = 18	N = 18	N = 96	N = 96	N = 85	N = 47
	Średnia <i>Mean</i>	Mediana <i>Median</i>	Średnia <i>Mean</i>	Mediana <i>Median</i>	Średnia <i>Mean</i>	Mediana <i>Median</i>
	(p 25–75)	(p 25–75)	± SD	(p 10–90)	± SD	(p 10–90)
Całkowita liczba komórek $\times 10^6/g$ <i>Total cell count $\times 10^6/g$</i>	1,3*	1,7*	4,1 ± 4,8	2,4 (9,06–9,7)	2,9 ± 2,6	2,0 0,57–6,66
Makrofagi (%) <i>Macrophages (%)</i>	44,5 (28–77)	51,5 (31–64)	58,8 ± 21,0	60,8 (33–86)	49,3 ± 18,9	52 24,2–73,7
$\times 10^5/g$	0,90 (0,50–1,27)	1,03 (0,53–1,69)	2,12 ± 2,02	1,64 (0,29–4,85)	1,21 ± 0,98	0,92 0,3–2,3
Limfocyty (%) <i>Lymphocytes (%)</i>	2,9 (1,9–5,3)	3,5 (1,8–4,45)	1,0 ± 1,1	0,5 (0,01–2,6)	1,4 ± 1,4	1,4 0,0–3,3
$\times 10^5/g$	0,05 (0,03–0,10)	0,085 (0,07–0,12)	0,04 ± 0,07	0,02 (0,009–0,09)	0,03 ± 0,03	0,2 0,0–0,07
Granulocyty obojętnochłonne (%) <i>Neutrophils (%)</i>	46 (17–64)	42 (31–63)	37,5 ± 20	36,7 (11–64,4)	48,5 ± 19,4	45,7 22,5–74,6
$\times 10^5/g$	0,70 (0,33–1,25)	0,96 (0,59–1,73)	1,96 ± 3,03	0,865 (0,09–4,86)	1,68 ± 2,04	0,91 0,15–4,0
Granulocyty kwasochłonne (%) <i>Eosinophils (%)</i>	0 (0,0–1,3)	2 (0,35–3,8)	0,4 ± 0,9	0,0 (0,0–1,1)	0,8 ± 1,2	0,4 0,0–2,4
$\times 10^5/g$	0,01 (0,00–0,02)	0,065 (0,048–0,095)	0,013 ± 0,037	0,0 (0,0–0,042)	0,2 ± 0,5	0,01 0,0–0,06

*Liczba bezwzględna komórek $\times 10^6/g$ Total cell count expressed as : $\times 10^6$

ra ultradźwiękowego o niskiej (do 1 ml/min) i wysokiej wydajności [1, 68], jednak w pojedynczych badaniach wykazano, że płwocina odkrztuszona w przebiegu indukcji za pomocą nebulizatora o wysokiej wydajności cechuje się znamienne większą żywotnością komórek i mniejszym stężeniem IL-8 i ECP, niezależnie od czasu trwania procedury [67].

Czas między kolejnymi indukcjami:

- ponowne wykonanie indukcji płwociny przed upływem 48 godz. może być przyczyną zwiększonego odsetka neutrofilów w próbkach wydzieliny oskrzelowej [1, 69–71].

Zanieczyszczenie płwociny śliną [72]:

- domieszka śliny zmniejsza całkowitą liczbę komórek, nie ma jednak wpływu na skład odsetkowy komórek,
- zanieczyszczenie płwociny śliną obniża stężenie ECP i IL-8, próbki płwociny zawierające > 20% komórek płaskonabłonkowych (co odpowiada 70% domieszki śliny) mogą być nieodpowiednie dla oznaczenia stężenia ECP.

Czas między uzyskaniem materiału a rozpoczęciem opracowania płwociny w laboratorium [4, 23]:

- obecność w płwocinie bakterii jamy ustnej dróg oddechowych oraz licznych enzymów proteolitycznych przyczynia się do szybkiej utraty żywotności i lizy komórek,
- po upływie 2 godz. zmniejsza się żywotność komórek.

Zastosowanie DTT

- DTT, wpływając na budowę drugo- i trzeciorzędową białek, może doprowadzić do zmian ich właściwości immunologicznych, częściowo lub całkowicie uniemożliwiając ich wykrywanie w badanych płynach ustrojowych. Do wrażliwych na działanie DTT białek należą między innymi: mieloperoksydaza (MPO), peroksydaza eozynofilowa (EPO), czynnik zahamowania migracji makrofagów (MIF), interleukina-5 (IL-5) (obserwuje się zmniejszenie stężenia pod wpływem DTT) [3, 73]. Dithiothreitol nie wpływa na ilość ECP, EPX, IL-8 i tryptazy, może zmniejszać żywotność komórek [32].
- aby uniknąć wpływu DTT, można stosować pewne modyfikacje, takie jak:
 - dodanie do roztworu DTT albuminy surowicy bydlęcej (BSA), której ochronne działanie na białka stabilizowało komórki

i znacząco poprawiło wykrywalność takich cytokin, jak: IL-6, IL-8, MIF oraz MPO [51],

- oznaczanie stężeń w części materiału opracowanego bez DTT, np. MPO, α_1 -antytrypsyny (ATT), leukotrienu-B4 (LTB4) [74],
 - dodanie do próbki płwociny mieszaniny inhibitorów enzymów proteolitycznych w znacznym stopniu poprawia wykrywalność IL-5 [75–77],
 - użycie ultradźwięków do homogenizacji płwociny, co daje zadowalające wyniki w oznaczaniu MPO i EPO [54].
- DTT ma wpływ na antygeny powierzchniowe komórek zapalnych izolowanych z płwociny indukowanej [55, 78]. Wykazano, że wysokie stężenia i czas ekspozycji na DTT mogą niekorzystnie wpływać na ekspresję powierzchniowego antygenu EG2 dla ECP występującego na błonach komórkowych granulocytów kwasochłonnych, natomiast nie mają wpływu w odniesieniu do antygenów dla IL-8, TNF- α oraz czynnika stymulującego powstawanie kolonii granulocytów i monocytów (GM-CSF) [34]. Van Overveld i wsp. stwierdzili szkodliwość oddziaływania DTT na funkcje granulocytów obojętnochłonnych [79].

Zastosowanie PBS

Zmniejsza stężenie ECP w próbce płwociny.

Filtrowanie homogenatu płwociny

Powoduje niewielkie obniżenie całkowitej liczby komórek, jednak nie ma to wpływu na skład odsetkowy komórek płwociny; filtrowanie wpływa na poprawę jakości preparatów cytologicznych [32]. Nieznany jest wpływ filtrowania homogenatu płwociny przez filtry o innych rozmiarach oczek na całkowitą liczbę oraz skład odsetkowy komórek zapalnych.

Dym papierosowy

Szczególny wpływ na zmianę składu komórkowego wydzieliny oskrzelowej ma palenie papierosów. W przypadku płwociny indukowanej obserwuje się zwiększenie całkowitej liczby komórek oraz zwiększenie odsetka i liczby granulocytów obojętnochłonnych [41, 62, 63, 80, 81]. Zmiany w morfologii makrofagów polegają na obecności pyłów w ich cytoplazmie oraz napływie młodych form o fenotypie monocytów [63, 82]. Obserwowano także zwiększenie odsetka granulocytów kwasochłonnych u czynnych palaczy, szczególnie jeśli występowały objawy obturacji oskrzeli [83]. W dotychczasowych badaniach wykazano, że u cho-

rych na POChP zmiany związane z paleniem papierosów mają charakter przetrwały [83–85]. Nie wyjaśniono dotychczas, czy u zdrowych osób zmiany cofają się po zaprzestaniu palenia.

Czynniki demograficzne

- Stwierdzono, że wraz z wiekiem wzrasta odsetek granulocytów obojętnochłonnych w płwocinie u osób zdrowych [61].
- Skuteczność indukcji płwociny u dzieci wykazywana jest przez różnych autorów w szerokich granicach: od 60 do 100% [8, 30, 86]. Skuteczność indukcji płwociny zmienia się w zależności od wieku badanych dzieci. Adekwatną próbkę płwociny uzyskano u 67% badanych 5-latków, u 75% — 6-latków, u 86% — 7–10-latków i u 100% dzieci powyżej 10. rż.

Piśmiennictwo

1. Paggiaro P.L., Chanez P., Holz O. i wsp. Sputum induction. Eur. Respir. J. 2002; 20 (supl. 37): 3–8.
2. Bhowmik A., Seemungal T.A., Sapsford R.J. i wsp. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1998; 53: 953–956.
3. Kelly M.M., Keatings V., Leigh R. i wsp. Analysis of fluid-phase mediators. Eur. Respir. J. 2002; 20 (supl. 37): 24–39.
4. Pizzichini E., Pizzichini M.M., Efthimiadis A. i wsp. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 154: 308–317.
5. Pavord I.D., Sterk P.J., Hargreave F.E. i wsp. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. Eur. Respir. J. Suppl. 2002; 37: 40–43.
6. Fireman E. Induced sputum: opening a new window to the lung. Sarcoidosis. Vasc. Diffuse. Lung. Dis. 2001; 18: 263–271.
7. Fireman E., Topilsky I., Greif J. i wsp. Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage for evaluating patients with sarcoidosis and non-granulomatous interstitial lung disease. Respir. Med. 1999; 93: 827–834.
8. Lovett C.J., Whitehead B.F., Gibson P.G. Eosinophilic airway inflammation and the prognosis of childhood asthma. Clin. Exp. Allergy 2007; 37: 1594–1601.
9. Gibson P.G., Simpson J.L., Hankin R. i wsp. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. Thorax 2003; 58: 116–121.
10. Sagel S.D., Kapsner R., Osberg I. i wsp. Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 164: 1425–1431.
11. Mayer-Hamblett N., Aitken M.L., Accurso F.J. i wsp. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007; 175: 822–828.
12. Dakin C.J., Pereira J.K., Henry R.L. i wsp. Relationship between sputum inflammatory markers, lung function, and lung pathology on high-resolution computed tomography in children with cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol. 2002; 33: 475–482.
13. Pradal M., Retornaz K., Poisson A. Chronic cough in childhood. Rev. Mal. Respir. 2004; 21: 743–762.
14. Guran T., Ersu R., Karadag B. i wsp. Association between inflammatory markers in induced sputum and clinical characteristics in children with non-cystic fibrosis bronchiectasis. Pediatr. Pulmonol. 2007; 42: 362–369.
15. Gibson P.G., Simpson J.L., Chalmers A.C. i wsp. Airway eosinophilia is associated with wheeze but is uncommon in children with persistent cough and frequent chest colds. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 164: 977–981.
16. Li A.M., Hung E., Tsang T. i wsp. Induced sputum inflammatory measures correlate with disease severity in children with obstructive sleep apnoea. Thorax 2007; 62: 75–79.
17. Zihlif N., Paraskakis E., Tripoli C. i wsp. Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. Pediatr. Pulmonol. 2006; 41: 509–514.
18. Zar H.J., Tannenbaum E., Hanslo D. i wsp. Sputum induction as a diagnostic tool for community-acquired pneumonia in infants and young children from a high HIV prevalence area. Pediatr. Pulmonol. 2003; 36: 58–62.
19. Zar H.J., Hanslo D., Apolles P. i wsp. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. Lancet 2005; 365: 130–134.
20. Soferman R., Fireman E. The assessment of induced sputum in detecting *Aspergillus fumigatus* hyphae in steroid-dependent unstable asthma. Allergy 2006; 61: 1150–1151.
21. Zacharasiewicz A., Erin E.M., Bush A. Noninvasive monitoring of airway inflammation and steroid reduction in children with asthma. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2006; 6: 155–160.
22. Górski P., Szmidt M., Grupa robocza: Testy prowokacyjne w alergii wziewnej. Standardy w alergologii, część I. Pod patronatem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. The UCB Institute of Allergy, Belgium 2003; 37–42.
23. Miller M.R., Hankinson J., Brusasco V. i wsp. ATS/ERS Task Force. Standardisation on spirometry. Eur. Respir. J. 2005; 26: 319–338.
24. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące wykonywania badań spirometrycznych. Franczak M., Antczak A. (red.). Pneumonol. Alergol. Pol. 2006; (supl. 1), 74: 13–16.
25. Covar R.A., Spahn J.D., Martin R.J. i wsp. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 2004; 114: 575–582.
26. Gibson P.G., Grootendor D.C., Henry R.L. i wsp. Sputum induction in children. Eur. Respir. J. 2002; 20: 44–46.
27. Suri R., Marshall L.J., Wallis C. i wsp. Safety and use of sputum induction in children with cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol. 2003; 35: 309–313.
28. Jones P.D., Hankin R., Simpson J. i wsp. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 164: 1146–1149.
29. Spanevello A., Beghe B., Bianchi A. i wsp. Comparison of two methods of processing induced sputum: selected versus entire sputum. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 157: 665–668.
30. Pin I., Gibson P.G., Kolendowicz R. i wsp. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. Thorax 1992; 47: 25–29.
31. Fahy J.V., Liu J., Wong H. i wsp. Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studying allergic airway inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. 1994; 93: 1031–1039.
32. Efthimiadis A., Spanevello A., Hamid Q. i wsp. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. Eur. Respir. J. 2002; 37: 19–23.
33. Efthimiadis A., Jayaram L., Weston S. i wsp. Induced sputum: time from expectoration to processing. Eur. Respir. J. 2002; 19: 706–708.
34. Popov T., Gottschalk R., Kolendowicz R. i wsp. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. Clin. Exp. Allergy 1994; 24: 778–783.
35. Popov T.A., Pizzichini M.M., Pizzichini E. i wsp. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. Eur. Respir. J. 1995; 8: 559–565.
36. Pavord I.D., Pizzichini M.M., Pizzichini E. i wsp. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. Thorax 1997; 52: 498–501.
37. Jayaram L., Parameswaran K., Sears M.R. i wsp. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. Eur. Respir. J. 2000; 16: 150–158.
38. Gershman N.H., Wong H.H., Liu J.T. i wsp. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. Eur. Respir. J. 1996; 9: 2448–2453.
39. Efthimiadis A., Pizzichini M.M., Pizzichini E. i wsp. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. Eur. Respir. J. 1997; 10: 1336–1340.
40. Pizzichini M.M., Popov T.A., Efthimiadis A. i wsp. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 154: 866–869.
41. Sozańska E., Gąsior G., Semik A. i wsp. Zakres wartości prawidłowych dla komórek występujących w indukowanej płwocinie w populacji śląskiej. Pneumonol. Alergol. Pol. 2005; 73: 148–152.
42. Pizzichini E., Pizzichini M.M., Efthimiadis A. i wsp. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. Eur. Respir. J. 1996; 9: 1174–1180.

43. Fleury-Feith J., Escudier E., Pocholle M.J. i wsp. The effects of cyto centrifugation on differential cell counts in samples obtained by bronchoalveolar lavage. *Acta. Cytol.* 1987; 31: 606–610.
44. Gauvreau G.M., Lee J.M., Watson R.M. i wsp. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 1473–1478.
45. Kelly M.M., Hargreave F.E., Cox G. A method to preserve sputum for delayed examination. *Eur. Respir. J.* 2003; 22: 996–1000.
46. Wooten O.J., Dulfano M.J. Improved homogenization techniques for sputum cytology counts. *Ann. Allergy* 1978; 41: 150–154.
47. Saraiva-Romanholo B.M., Barnabe V., Carvalho A.L. i wsp. Comparison of three methods for differential cell count in induced sputum. *Chest* 2003; 124: 1060–1066.
48. Ryttilä P., Metso T., Petays T. i wsp. Eosinophilic airway inflammation as an underlying mechanism of undiagnosed prolonged cough in primary healthcare patients. *Respir. Med.* 2002; 96: 52–58.
49. Metso T., Ryttilä P., Peterson C. i wsp. Granulocyte markers in induced sputum in patients with respiratory disorders and healthy persons obtained by two sputum-processing methods. *Respir. Med.* 2001; 95: 48–55.
50. Ronchi M.C., Galli G., Zonefrati R. i wsp. Sputum processing: a new method to improve cytospin quality. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32: 674–680.
51. Pignatti P., Delmastro M., Perfetti L. i wsp. Is dithiothreitol affecting cells and soluble mediators during sputum processing? A modified methodology to process sputum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 667–668.
52. Mameessier E., Boniface S., Dupuy P. i wsp. Study of cytokine gene expression in small cell samples: use in induced sputum. *J. Immunol. Methods* 2003; 280: 37–47.
53. Louis R., Shute J., Goldring K. i wsp. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 660–667.
54. Grebski E., Peterson C., Medici T.C. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients. *Chest* 2001; 119: 1521–1525.
55. Qiu D., Tan W.C. Dithiothreitol has a dose-response effect on cell surface antigen expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103: 873–876.
56. Kim J.S., Hackley G.H., Okamoto K. i wsp. Sputum processing for evaluation of inflammatory mediators. *Pediatr. Pulmonol.* 2001; 32: 152–158.
57. Barczyk A., Pierzchała W., Sozańska E. Stężenia CC-chemokin (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) w indukowanej płwocinie u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc i u chorych na przewlekłe zapalenie oskrzeli. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2001; 69: 40–49.
58. Prince P., Bertrand M., Boulay M.E. i wsp. Optimization of the conditions for preservation of induced sputum: influence of freezing on cellular analysis. *Chest* 2005; 128: 980–985.
59. Keatings V.M., Barnes P.J. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 449–453.
60. Domagała-Kulawik J. Trudności interpretacyjne w ocenie rozmazów komórkowych BAL i płwociny indukowanej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2007; 75: 261–267.
61. Thomas R.A., Green R.H., Brightling C.E. i wsp. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest* 2004; 126: 1811–1814.
62. Belda J., Leigh R., Parameswaran K. i wsp. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 475–478.
63. Domagała-Kulawik J., Maskey-Warzechowska M., Hermanowicz-Salamon J. i wsp. Expression of macrophage surface markers in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57 (supl. 4): 75–84.
64. Spanevello A., Confalonieri M., Sulotto F. i wsp. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162: 1172–1174.
65. Cataldo D., Foidart J.M., Lau L. i wsp. Induced sputum. Comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest* 2001; 120: 1815–1821.
66. Cianchetti S., Bacci E., Ruocco L. i wsp. Granulocyte markers in hypertonic and isotonic saline-induced sputum of asthmatic subjects. *Eur. Respir. J.* 2004; 24: 1018–1024.
67. Belda J., Hussack P., Dolovich M. i wsp. Sputum induction: effect of nebulizer output and inhalation time on cell counts and fluid-phase measures. *Clin. Exp. Allergy* 2001; 31: 1740–1744.
68. Kelly M.G., Brown V., Martin S.L. i wsp. Comparison of sputum induction using high-output and low-output ultrasonic nebulizers in normal subjects and patients with COPD. *Chest* 2002; 122: 955–959.
69. Richter K., Holz O., Jörres R.A. i wsp. Sequentially induced sputum in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1999; 14: 697–701.
70. Nightingale J.A., Rogers D.F., Barnes P.J. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 1998; 53: 87–90.
71. Holz O., Richter K., Jörres R.A. i wsp. Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days. *Thorax* 1998; 53: 83–86.
72. Simpson J.L., Timmins N.L., Fakes K. i wsp. Effect of saliva contamination on induced sputum cell counts, IL-8 and eosinophil cationic protein levels. *Eur. Respir. J.* 2004; 23: 759–762.
73. Erin E.M., Barnes P.J., Hansel T.T. Optimizing sputum methodology. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32: 653–657.
74. Woolhouse I.S., Bayley D.L., Stockley R.A. Effect of sputum processing with dithiothreitol on the detection of inflammatory mediators in chronic bronchitis and bronchiectasis. *Thorax* 2002; 57: 667–671.
75. Kelly M.M., Leigh R., Carruthers S. i wsp. Increased detection of interleukin-5 in sputum by addition of protease inhibitors. *Eur. Respir. J.* 2001; 18: 685–691.
76. Kelly M.M., Leigh R., Horwood P. i wsp. Induced sputum: validity of fluid-phase IL-5 measurement. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 105: 1162–1168.
77. Simpson J.L., Gibson P.G., Wark P.A. Optimization of sputum-processing methods for the measurement of interleukin-5: effects of protease inhibition. *Respirology* 2002; 7: 111–116.
78. Loppow D., Bottcher M., Gercken G. i wsp. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. *Eur. Respir. J.* 2000; 16: 324–329.
79. van Overveld F.J., Demkow U., Gorecka D. i wsp. Effects of homogenization of induced sputum by dithiothreitol on polymorphonuclear cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 56: 143–154.
80. van der Voort P.H., Postma D.S., Timens W. i wsp. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respir. Res.* 2005; 6: 22.
81. Lensmar C., Elmberger G., Sandgren P. i wsp. Leukocyte counts and macrophage phenotypes in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid from normal subjects. *Eur. Respir. J.* 1998; 12: 595–600.
82. Frankenberger M., Menzel M., Betz R. i wsp. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 138: 507–516.
83. Domagała-Kulawik J., Maskey-Warzechowska M., Kraszewski I. i wsp. The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD. *Chest* 2003; 123: 1054–1059.
84. Gamble E., Grootendorst D.C., Hattotuwa K. i wsp. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: apooled analysis. *Eur. Respir. J.* 2007; 30: 467–471.
85. Willemse B.W., Postma D.S., Timens W. i wsp. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur. Respir. J.* 2004; 23: 464–476.
86. Kyrczyk Z. Badanie indukowanej płwociny w ocenie zapalenia u dzieci chorych na astmę oskrzelową. Rozprawa doktorska. AM Poznań 2006.

Załącznik 1

Sprzęt potrzebny do przeprowadzenia indukcji płwociny:

- nebulizator ultradźwiękowy o wydajności 1 ml/min,*
- roztwory 3%, 4% i 5% chlorku sodu (NaCl),
- pulsoksymetr,
- spirometr spełniający wymogi ATS/ERS,
- aparat do mierzenia ciśnienia tętniczego,
- jałowe pojemniki na płwocinę,
- leki i aparatura umożliwiające monitorowanie czynności pracy serca w przypadku wystąpienia działań niepożądanych.

Materiały i sprzęt potrzebne do opracowania wyindukowanej płwociny:

- cytowirówka z wyposażeniem,
- wirówka stołowa,
- waga analityczna,
- mikroskop świetlny,
- wytrząsarka (*vortex*),
- kołyska laboratoryjna,
- komora hematologiczna (Neubauera lub Bürkera),
- szkiełka mikroskopowe podstawowe i nakrywkowe,
- zestaw do wybarwiania preparatów cytologicznych (barwiacz — 4 sztuki, cylinder o pojemności 100 ml),
- płytka Petriego,
- kleszczyki tępe,
- pipety automatyczne o regulowanej pojemności na maksymalną pojemność 5 ml, 1 ml, 200 μ l, 50 μ l,
- pipety pasteurowskie,
- sterylne, zamykane naczynie o pojemności ok. 30 ml,
- gaza nylonowa o średnicy oczek 48–52 μ m lub inne filtry o podobnych rozmiarach,
- probówki wirówkowe,
- probówki typu eppendorf.

Odczynniki niezbędne do opracowania płwociny indukowanej:

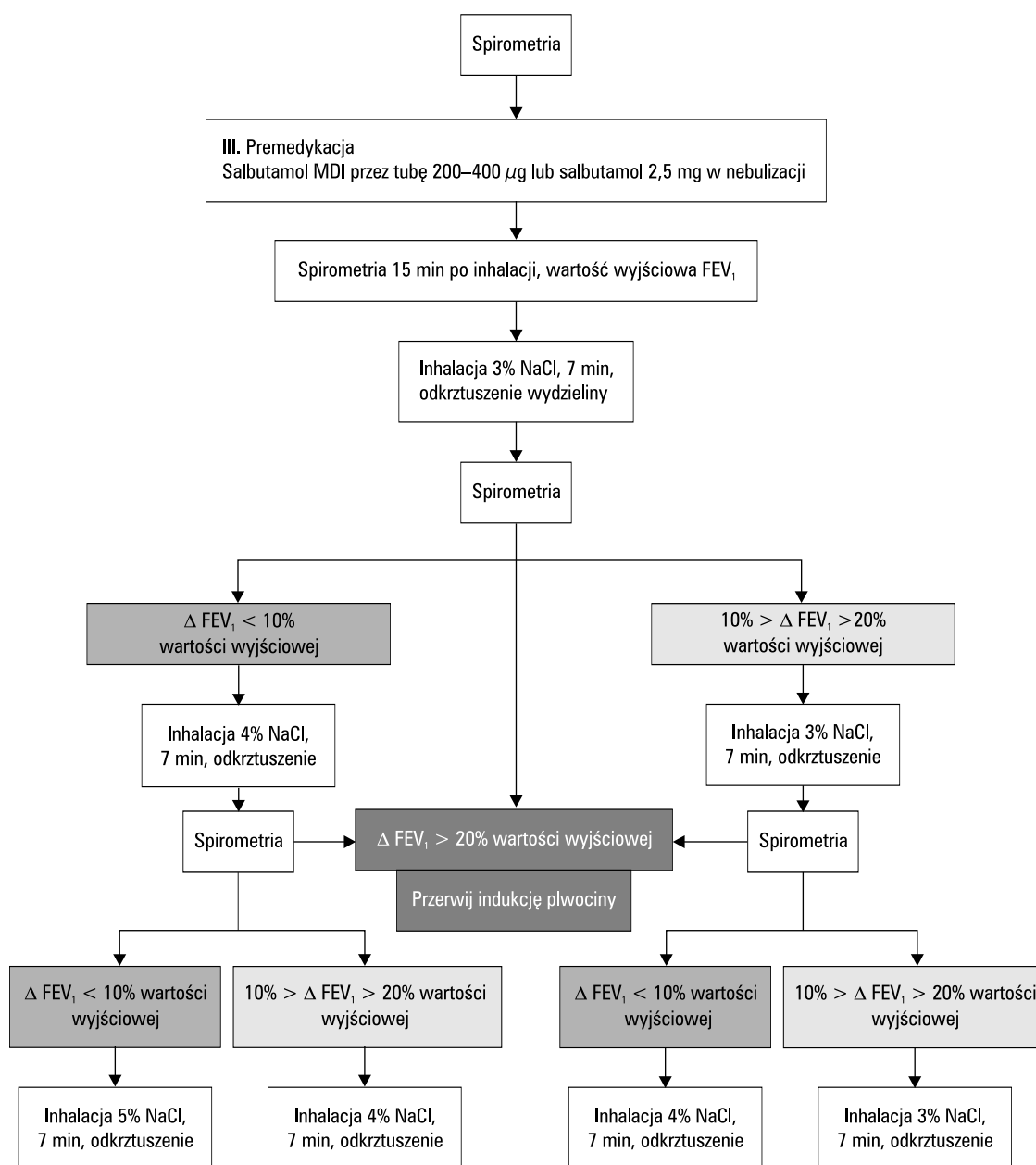
- Dulbecco PBS (DPBS),
- dithiothreitol (DTT),**
- barwniki hematologiczne do liczenia komórek w komorze hematologicznej,
- *Trypan Blue*,
- odczynnik May-Grünwalda,
- odczynnik Giemsy,
- woda destylowana.

*Do wykonywania indukcji płwociny rekomenduje się nebulizatory ultradźwiękowe o wydajności 1 ml/min. Nebulizatory charakteryzujące się wydajnością generacji aerozolu większą niż 1 ml/min są przez chorych gorzej tolerowane [67, 68]. Dopuszcza się stosowanie w indukcji płwociny nebulizatorów pneumatycznych, jednak ich skuteczność w indukcji płwociny jest oceniana jako mniejsza [35]

**DTT jest to odczynnik sulfhydrylowy, który w kontakcie z płwociną powoduje pękanie wiązań dwusiarczkowych krzyżowo łączących ze sobą włókna glikoprotein, które utrzymują płwocinę w jej żelowej formie. Następstwem takiej reakcji jest zmniejszenie lepkości i upłynnienie płwociny i łatwiejsze doprowadzenie uwolnionych komórek i rozpuszczonych białek do postaci jednorodnej mieszaniny. Pierwszymi badaczami, którzy w 1978 r. wprowadzili ten sposób homogenizacji płwociny byli Wooten i Dulfano [46]. Płwocinę próbowano homogenizować również za pomocą innych odczynników, takich jak pankreatyna, tripsyna, acetyl cysteina czy też za pomocą ultradźwięków. Zastosowanie DTT okazało się jednak najkorzystniejsze. Badanie indukowanej płwociny dzięki użyciu DTT zyskało na znaczeniu jako metoda ilościowa. Dobrze zhomogenizowana płwocina pozwala na dokładne i powtarzalne wyliczanie całkowitej liczby komórek. W preparatach cytologicznych, dzięki regularnej dyspersji, komórki są lepiej widoczne, a ich rozróżnianie bardziej wiarygodne. Dotyczy to szczególnie granulocytów kwasochłonnych, które mają tendencję do tworzenia skupisk [34, 39, 46]

Załącznik 2

Schemat wykonywania indukcji płwociny



I skrócony opis indukcji płwociny:

- poinformowanie chorego o zasadach i celu badania, a następnie podpisanie przez niego świadomej zgody na to badanie;
- dokładna toaleta jamy ustnej oraz oczyszczenie nosa przed badaniem;
- spirometria (tzw. wstępna);
- premedykacja 200–400 µg salbutamolu MDI (przez tubę) lub 2,5 mg salbutamolu w nebulizacji;
- spirometria 15 min po premedykacji (tzw. wyjściowa);
- ciągły pomiar saturacji krwi w czasie indukcji płwociny za pomocą pulsoksymetru;
- pierwszy cykl indukcji płwociny przy użyciu nebulizatora ultradźwiękowego i 3% roztworu NaCl przez 7 min, kończący się zachęceniem pacjenta do kaszlu i odkrztuszenia wydzieliny oskrzelowej do jałowego pojemnika;
- kontrolna spirometria, ocena kliniczna i decyzja o kontynuacji indukcji płwociny;
- kontynuacja indukcji płwociny (cykl 2. i 3.) w tych samych warunkach, z tym samym stężeniem roztworu chlorku sodu (3%);
- zabezpieczenie odkrztuszonej płwociny w sterylnych pojemnikach.

PROTOKÓŁ PROWADZENIA INDUKCJI PLWOCINY STAŁYM STĘŻENIEM CHLORKU SODU (3% NaCl)

Imię i nazwisko chorego....., wiek

Przed rozpoczęciem indukcji plwociny:

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

Wstępna spirometria (przed bronchodylatatorem):

FEV₁ [l], FEV₁%nal

FVC [l], FVC%nal

FEV₁/FVC

Spirometria (tzw. wyjściowa, po premedykacji) (salbutamol 200–400 µg MDI przez tubę lub salbutamol 2,5 mg w nebulizacji)

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], FEV₁%nal

Po 1. cyklu indukcji plwociny:

HR/min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], ΔFEV₁

Decyzja o kontynuacji indukcji plwociny

Po 2. cyklu indukcji plwociny:

HR/min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], ΔFEV₁

Decyzja o kontynuacji indukcji plwociny

Po 3. cyklu indukcji plwociny:

HR/min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], ΔFEV₁

ΔFEV₁ — różnica między wartością wyjściową FEV₁ (czyli po salbutamolu) i FEV₁ po zakończeniu każdego cyklu indukcji plwociny

II skrócony opis indukcji plwociny:

- poinformowanie chorego o zasadach i celu badania, a następnie podpisanie przez niego świadomej zgody na to badanie;
- dokładna toaleta jamy ustnej oraz oczyszczenie nosa przed badaniem;
- spirometria (tzw. wstępna);
- premedykacja 200–400 µg salbutamolu MDI (przez tubę) lub 2,5 mg salbutamolu w nebulizacji;
- spirometria 15 min po premedykacji (tzw. wyjściowa);
- ciągły pomiar saturacji krwi w czasie indukcji plwociny za pomocą pulsoksymetru;
- pierwszy cykl indukcji plwociny przy użyciu nebulizatora ultradźwiękowego i 3% roztworu NaCl przez 7 min, kończący się zachęceniem pacjenta do kaszlu i odrzucenia wydzieliny oskrzelowej do jałowego pojemnika;
- kontrolna spirometria, ocena kliniczna i decyzja o kontynuacji indukcji plwociny;
- kontynuacja indukcji plwociny (cykl 2. i 3.) w tych samych warunkach, ze wzrastającym stężeniem roztworu NaCl do 4% w cyklu 2. i 5% w cyklu 3., jeśli ew. spadek FEV₁ < 10% wartości wyjściowej FEV₁; przy ewentualnym spadku FEV₁ o 10–20% wartości wyjściowej FEV₁ należy kontynuować indukcję poprzednim stężeniem roztworu chlorku sodu;
- zabezpieczenie odkrztuszonej plwociny w sterylnych pojemnikach.

PROTOKÓŁ PROWADZENIA INDUKCJI PŁWOCINY WZRASTAJĄCYM STĘŻENIEM CHLORKU SODU (3%, 4%, 5% NaCl)

Imię i nazwisko chorego....., wiek

Przed rozpoczęciem indukcji płwociny:

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

Wstępna spirometria (przed bronchodylatatorem):

FEV₁ [l], FEV₁%nal

FVC [l], FVC%nal

FEV₁/FVC

Spirometria (tzw. wyjściowa, po premedykacji) (salbutamol 200–400 µg MDI przez tubę
lub salbutamol 2,5 mg w nebulizacji)

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], FEV₁%nal

Po 1. cyklu indukcji płwociny:

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], ΔFEV₁

Decyzja o kontynuacji indukcji płwociny i stężeniu NaCl.....

Po 2. cyklu indukcji płwociny:

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], ΔFEV₁

Decyzja o kontynuacji indukcji płwociny i stężeniu NaCl.....

Po 3. cyklu indukcji płwociny:

HR...../min, częstość oddechów /min

SatO₂

(przy optymalnej tlenoterapii, jeśli jest wskazana)

FEV₁ [l], ΔFEV₁

ΔFEV₁ — różnica między wartością wyjściową FEV₁ (czyli po salbutamolu) i FEV₁ po zakończeniu każdego cyklu indukcji płwociny

Załącznik 3

Obróbka płwociny indukowanej na podstawie zaleceń *European Respiratory Society* (Europejskiego Towarzystwa Oddechowego) (druga wersja uproszczona)

Poszczególne etapy	Materiał nieselekcjonowany	Materiał selekcjonowany
Postępowanie wstępne	Materiał przełożyć do zważonej, polistyrenowej probówki; zmierzyć objętość	Materiał przełożyć na płytkę Petriego; oddzielić od śliny 100–500 mg płwociny; przełożyć do zważonej polistyrenowej probówki; całość zważyć
Homogenizacja	Dodać 0,1% roztwór DTT w PBS o objętości równej objętości płwociny; homogenizować przez aspirację pipetą ok. 10 razy i wytrząsać na wytrząsarce wirowej; mieszać przez 15 min na kołysce laboratoryjnej w temp. 22°C	Dodać 0,1% roztwór DTT w PBS o objętości równej 4-krotnej wadze płwociny; homogenizować przez aspirację za pomocą pipety ok. 10 razy; mieszać przez 15 min na kołysce laboratoryjnej w temp. 22°C
Rozcieńczenie	Dodanie DPBS w objętości równej objętości wyjściowej płwociny + objętości dodanego roztworu DTT (czyli ok. 2 × większa objętość od wyjściowej)	Dodanie DPBS w objętości równej objętości wyjściowej płwociny + objętości dodanego roztworu DTT (czyli ok. 2 × większa objętość od wyjściowej)
Filtrowanie	Przefiltrować przez filtr nylonowy do zważonej probówki wirówkowej; całość zważyć	Przefiltrować przez filtr nylonowy do zważonej probówki wirówkowej; całość zważyć
Wyliczenie całkowitej liczby komórek	Metoda manualna za pomocą hemocytometru; wynik: $\times 10^5$ na ml całego odkrztuszonego materiału	Metoda manualna za pomocą hemocytometru; wynik: $\times 10^6$ na g wyselekcjonowanej płwociny
Żywotność komórek nienabłonkowych	Metoda manualna za pomocą błękitu trypanu w hemocytometrze; wynik w procentach	Metoda manualna za pomocą błękitu trypanu w hemocytometrze; wynik w procentach
Wirowanie	300–400 × g, 10 min	300–400 × g, 10 min
Supernatant	Delikatnie odciągnąć supernatant i zamrozić w temp. od –20°C do –70°C	Delikatnie odciągnąć supernatant i zamrozić w temp. od –20°C do –70°C
Przygotowanie komórek do cytospinu	40–60 × 10 ³ komórek/cytospin; wykonać 2 cytospiny	40–60 × 10 ³ komórek/cytospin; wykonać 2 cytospiny
Wirowanie cytospinu	6 min, 22 × g	6 min, 22 × g
Barwienie preparatów	2 preparaty — metoda May-Grünwalda/Giemsy, 1–2 preparaty hematoksylina-eozyna	2 preparaty — metoda May-Grünwalda/Giemsy, 1–2 preparaty hematoksylina-eozyna
Ocena preparatów w mikroskopie świetlnym	Policzyć min. 300 kolejnych nienabłonkowych komórek w każdym z dwóch preparatów; poszczególne rodzaje komórek wyrazić jako % komórek nienabłonkowych	Policzyć min. 300 kolejnych nienabłonkowych komórek w każdym z dwóch preparatów; poszczególne rodzaje komórek wyrazić jako % komórek nienabłonkowych

Załącznik 4

SKIEROWANIE NA BADANIE PLWOCINY INDUKOWANEJ

Nazwa Ośrodka.....

Data

Skierowanie na badanie plwociny indukowanej

Nazwisko.....Imię

Data urodzenia

PESEL

Lekarz kierujący

Rozpoznanie kliniczne

Palacz: tak.....(liczba paczko/lat)..... nieex

Badanie diagnostyczne.....naukowe

Co badanie ma wyjaśnić.....

.....

Czy jednocześnie wykonywane jest badanie bakteriologiczne/czy jest podejrzenie procesu swoistego

.....

Podpis lekarza

WYNIK BADANIA CYTOLOGICZNEGO PLWOCINY INDUKOWANEJ

Nazwa Pracowni

Data.....

Wynik badania plwociny indukowanej

Nr badania

Nazwisko.....Imię

Data urodzenia

PESEL

Liczba komórek $\times 10^6/g$ [ml]

Żywotność komórek (%)

Komórki nabłonka płaskiego%

Makrofagi %

Limfocyty %

Granulocyty obojętnochłonne %

Granulocyty kwasochłonne %

Inne*

Wniosek

.....

Podpis

Norma

Makrofagi: 40–60%

Limfocyty: < 4%

Granulocyty obojętnochłonne: 30–50%

Granulocyty kwasochłonne: < 3%

*Tu: bakterie, inne drobnoustroje, komórki dysplastyczne, nowotworowe