

**Małgorzata Sobiecka¹, Jan Kuś¹, Adam Józwiak², Urszula Demkow³, Małgorzata Filewska³,
Małgorzata Szolkowska⁴**¹Klinika Chorób Płuc Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Kuś

²Pracownia Analizy Danych Biomedycznych, Państwowa Akademia Nauk w Warszawie

Kierownik: dr hab. inż. A. Józwiak

³Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. U. Demkow

⁴Zakład Patologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: dr n. med. R. Langfort

Znaczenie diagnostyczne indukowanej plwociny w chorobach śródmiąższowych płuc

Diagnostic value of induced sputum in interstitial lung disease

Abstract

Background: Induced sputum (IS) has been recently used to investigate pulmonary inflammation in patients with interstitial lung disease (ILD), but still little attention has been paid to its efficacy in diagnosing sarcoidosis and other ILD. The aim of this study was to evaluate the diagnostic value of IS differential cell count and CD4+/CD8+ ratio in sarcoidosis (SA) and nonsarcoidosis ILD (NSA ILD).

Material and methods: We studied prospectively newly diagnosed 59 patients: 36 SA and 23 NSA ILD [16 hypersensitivity pneumonitis (HP) and 7 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)]. IS was performed by inhaling a 5% NaCl solution for 4 periods of 5 minutes. Giemsa stained cytopreps were differentially counted and T-lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry method. The k-nearest neighbour rule (k-NN) or predictive value of CD4+/CD8+ ratio were used to discriminate between SA and NSA ILD. The variables of IS used in k-NN rule were: cells viability, total cell count, percentages of alveolar macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, CD4+ and CD8+ subsets, and CD4+/CD8+ ratio.

Results: 33 patients were able to produce an adequate sputum sample (SA — 15, HP — 11, IPF — 7). A CD4+/CD8+ ratio > 2,6 had a sensitivity of 100% and a specificity of 72% with 84% of correctly classified cases in distinguishing SA from NSA ILD. However, using k-NN rule the probability of correct classification was 79% (classification error rate — 21%).

Conclusion: To distinguish SA from NSA ILD cut off CD4+/CD8+ ratio > 2,6 alone was superior to k-NN rule using all the parameters of IS.

Key words: induced sputum, CD4+/CD8+ ratio, interstitial lung disease, sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis, idiopathic pulmonary fibrosis

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 1: 6–15

Streszczenie

Wstęp: Indukowana plwocina (IP) znalazła ostatnio zastosowanie w badaniach nad chorobami śródmiąższowymi płuc (ChŚP), jednak nadal nieliczne doniesienia dotyczą oceny wartości tej metody w diagnostyce różnicowej ChŚP. Celem badania było określenie wartości diagnostycznej składu komórkowego i wskaźnika CD4+/CD8+ w IP u chorych na sarkoidozę i inne ChŚP.

Materiał i metody: Do badania włączono 59 osób — 36 chorych na sarkoidozę, 16 na alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych (AZPP) i 7 na samoistne włóknienie płuc (SWP). Plwocinę indukowano minimum 7 dni po badaniu BAL za pomocą

Adres do korespondencji: dr n. med. Małgorzata Sobiecka, I Klinika Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: 22 43 12 147; faks: 22 43 12 443; e-mail: m.sobiecka@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.05.2010 r.

Copyright © 2011 Via Medica

ISSN 0867–7077

inhalacji 5-procentowego roztworu NaCl, trwającej 5 minut i powtarzanej 4-krotnie. Skład odsetkowy komórek oceniano w preparatach cytospinowych wybarwionych metodą Giemsy, licząc 400 komórek jednojądrowych. Analizę subpopulacji limfocytów T przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej. Możliwość różnicowania sarkoidozy od pozostałych ChŚP sprawdzano, określając wartość predykcyjną wskaźnika CD4+/CD8+ lub stosując metodę klasyfikacji obiektów na podstawie reguły k-najbliższych sąsiadów (k-NS). Zmiennymi stosowanymi w regule k-NS były parametry IP: żywotność komórek, całkowita liczba komórek, odsetek makrofagów, limfocytów, neutrofilów, eozynofilów, limfocytów CD4+ i CD8+ oraz wskaźnik CD4+/CD8+.

Wyniki: Ocena IP była możliwa u 33 pacjentów (sarkoidoza — 15, AZPP — 11 i SWP — 7). Wartość indeksu CD4+/CD8+ > 2,6 w IP cechowała się 100-procentową czułością, 72-procentową specyficznością i 84-procentowym prawdopodobieństwem postawienia prawidłowego rozpoznania w różnicowaniu sarkoidozy od AZPP i SWP. Natomiast stosując metodę opartą na regule k-NS, prawdopodobieństwo postawienia prawidłowego rozpoznania wyniosło 79% (oszacowany błąd klasyfikacji = 21%).

Wnioski: Zastosowanie metody klasyfikacji obiektów wykorzystującej regułę k-NS w diagnostyce różnicowej sarkoidozy AZPP i SWP na podstawie wszystkich parametrów IP nie wiązało się z wyższym prawdopodobieństwem postawienia prawidłowego rozpoznania niż analiza jedynie indeksu CD4+/CD8+.

Słowa kluczowe: indukowana płwocina, indeks CD4+/CD8+, choroby śródmiąższowe płuc, sarkoidoza, alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, samoistne włóknienie płuc

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 1: 6–15

Wstęp

Badanie płwociny w chorobach płuc ma wieloletnią tradycję, sięgającą końca XIX wieku. Jednak trudności z pozyskaniem próbki wystarczającej do analizy w wielu sytuacjach klinicznych uniemożliwiały zastosowanie jej jako narzędzia badawczego. Rozwiązanie tego problemu przez wprowadzenie indukcji płwociny za pomocą inhalacji hipertonicznego roztworu chlorku sodu u chorych na astmę oskrzelową ponad 18 lat temu skierowało uwagę na tą metodę i zaowocowało imponującym wzrostem badań nad jej wykorzystaniem w chorobach układu oddechowego [1]. Jako jedyna całkowicie nieinwazyjna metoda bezpośredniej oceny procesów zapalnych toczących się w drogach oddechowych pozwoliła na określenie rodzaju zapalenia komórkowego w różnych schorzeniach, między innymi w astmie oskrzelowej [2], przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP) [3] i przewlekłym kaszlu [4]. W latach 1992–2004 opublikowano ponad 650 prac dotyczących zastosowania indukowanej płwociny w diagnostyce i leczeniu astmy oskrzelowej oraz około 200 odnośnie jej wykorzystania w POChP i przewlekłym zapaleniu oskrzeli [5].

Natomiast doniesienia dotyczące zastosowania metody indukowania płwociny w badaniach nad chorobami śródmiąższowymi płuc (ChŚP [ILD, *interstitial lung disease*]) są nieliczne, a najwięcej publikacji dotyczy sarkoidozy. Mimo obiecujących wyników zaprezentowanych już prób wykorzystania indukowanej płwociny w diagnostyce ChŚP, znaczenie tej metody nie zostało jednoznacznie ustalone. Wynika to między innymi z przeświadczenia, że materiał uzyskany za pomocą indukcji płwociny i płukania oskrzelowo-pęcherzykowego

pochodzi z różnych obszarów płuc. Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*) odzwierciedla procesy zachodzące w obwodowych przestrzeniach powietrznych, podczas gdy próbki indukowanej płwociny pochodzą głównie z obszarów płuc charakteryzujących się obecnością wydzieliny bogatej w neutrofile, czyli uzyskanej przede wszystkim z dużych oskrzeli [6]. Kolejnym problemem analizy indukowanej płwociny jest stosunkowo mała liczba limfocytów w tym materiale. Jednak w kilku badaniach korzystnie oceniono metodę indukowania płwociny w odniesieniu do analizy płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w różnych ChŚP, jak również porównywano wyniki badania indukowanej płwociny od osób chorych i zdrowych ochotników [7–12]. Wykazano, że podobnie jak w BALF, w indukowanej płwocinie można stwierdzić limfocytozę w sarkoidozie [8, 10–12] i alergicznym zapaleniu pęcherzyków płucnych (AZPP) [9], a także dokonać oceny subpopulacji limfocytów T [7, 8, 11–13]. Natomiast w samoistnym włóknieniu płuc (SWP) ujawniono w indukowanej płwocinie, podobnie jak w BALF, wyższy odsetek eozynofilów [7] lub neutrofilów [14] w porównaniu z osobami zdrowymi.

Wysoki odsetek limfocytów w BALF nie jest jednak charakterystyczny dla sarkoidozy czy AZPP i stwierdza się go także w innych chorobach śródmiąższowych, infekcyjnych czy nowotworowych płuc [15]. Powszechnie wiadomo, że sarkoidoza charakteryzuje się obecnością przewlekłego procesu zapalnego w drogach oddechowych, w którym dominującą rolę odgrywają pobudzone limfocyty CD4+, a podwyższony stosunek limfocytów CD4+/CD8+ łącznie z dokładną oceną obrazu klinicznego choroby może mieć istotne znaczenie

w różnicowaniu sarkoidozy od innych ChŚP [16, 17]. Natomiast w AZPP w odpowiedzi na powtarzające się inhalacje drobnych cząstek antygenów dochodzi do aktywacji i nagromadzenia limfocytów T w dolnych drogach oddechowych oraz śródmiąższu płuc. Ocena fenotypowa limfocytów za pomocą przeciwciał monoklonalnych wykazała, że większość z tych komórek charakteryzuje się obecnością antygeny CD8+, a tylko nieliczna populacja komórek wykazuje ekspresję antygeny CD4+, co w konsekwencji prowadzi do odwrócenia stosunku limfocytów CD4+/CD8+, który na ogół nie przekracza 1 [18]. Niektórzy autorzy wyrażali w związku z tym pogląd, że określenie wskaźnika CD4+/CD8+ może być przydatne w różnicowaniu sarkoidozy i innych ChŚP, w tym AZPP [19]. W kilku badaniach wykazano silną korelację odsetka subpopulacji limfocytów T (CD4+ i CD8+) oraz indeksu CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie i BALF u chorych na różne ChŚP [7, 11–13]. Uzyskane wyniki wskazują, że analiza podtypów limfocytów T w próbkach indukowanej płwociny może być równie przydatna, jak analiza płynu uzyskanego podczas płukania oskrzelowo-płucnego (BAL, *bronchoalveolar lavage*) jako metoda identyfikowania zapalenia, w którym dominującą rolę odgrywają limfocyty CD4+ i różnicowania sarkoidozy i innych ChŚP [8].

W prezentowanym badaniu poszukiwano wartości predykcyjnej indeksu limfocytów CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie, różnicującej sarkoidozę od innych chorób śródmiąższowych płuc, jak również analizowano możliwość ustalenia rozpoznania na podstawie wszystkich parametrów indukowanej płwociny u chorych na ChŚP.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 59 pacjentów (26 kobiet — K i 33 mężczyzn — M) kolejno przyjmowanych do I Kliniki Chorób Płuc Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, u których w trakcie badań diagnostycznych rozpoznano sarkoidozę, AZPP lub SWP.

Rozpoznanie sarkoidozy (n = 36; M — 18, K — 18; średnia wieku: $35,3 \pm 8,9$ lat) ustalano na podstawie zaleceń przyjętych przez międzynarodowy panel ekspertów [20]. Kryterium rozpoznania sarkoidozy stanowiło badanie histopatologiczne wycinka z zajętego narządu wykazujące obecność nieserowaciejących ziarniniaków oraz zgodny obraz kliniczno-radiologiczny u 25 osób lub typowy obraz kliniczny i radiologiczny w badaniu konwencjonalnym i tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (TKWR) oraz wykluczenie

innych chorób o podobnym obrazie kliniczno-radiologicznym u 11 osób. Zgodnie z przyjętą klasyfikacją radiologiczną stanowiącą podstawę do podziału sarkoidozy na stadia choroby [21] 14 pacjentów zaliczono do I fazy, 20 do II fazy oraz 2 do III fazy. W grupie chorych na sarkoidozę było 8 palaczy tytoniu, 4 ekspalaczy oraz 24 niepalących.

Alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych rozpoznano u 16 osób (M — 11, K — 5, średnia wieku: $48,5 \pm 13,2$ lat) na podstawie kryteriów opublikowanych przez *American Thoracic Society* [22]. Na podstawie obrazu zmian stwierdzanych w badaniu TKWR u 11 osób rozpoznano podostrą postać AZPP, natomiast u 5 postaci przewlekłą [23]. W grupie chorych na AZPP było 12 niepalących pacjentów, 3 ekspalaczy i 1 aktualny palacz tytoniu.

Rozpoznanie SWP u 7 pacjentów (M — 4, K — 3) o średniej wieku $65,3 \pm 7,6$ ustalano na podstawie kliniczno-radiologicznych kryteriów opublikowane przez *American Thoracic Society/European Respiratory Society* [24], włączając charakterystyczny dla SWP obraz zmian radiologicznych w badaniu TKWR, natomiast u jednej pacjentki rozpoznanie dodatkowo zostało potwierdzone badaniem histopatologicznym wycinków płuca pobranych w czasie biopsji otwartej. Wśród 7 chorych na samoistne włóknienie płuc 2 osoby nigdy nie paliły papierosów, 4 zaprzestały palenia, a 1 pacjentka nadal paliła.

Żaden z pacjentów nie był leczony wziewnymi lub doustnymi kortykosteroidami, nie przyjmował leków immunosupresyjnych, jak też nie otrzymywał antybiotyków w okresie 3 miesięcy przed badaniem. Każdy pacjent po zapoznaniu się z protokołem badania wyraził zgodę na piśmie na udział w badaniu. Badanie uzyskało akceptację Komisji Etycznej przy Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc.

Indukowanie płwociny

Płwocinę indukowano za pomocą nebulizatora pneumatycznego PARI MASTER (PARI GmbH, Niemcy) o wydajności 0,5 ml/min, gwarantującego uzyskanie średniej średnicy cząstek aerozolu $3,6 \mu\text{m}$ według wcześniej opisanej metody [1, 10]. Wszyscy pacjenci otrzymywali nebulizację 5-procentowym roztworem NaCl, trwającą 5 minut i powtarzaną 4-krotnie. Po każdej inhalacji pacjent był proszony o przepłukanie jamy ustnej i gardła fizjologicznym roztworem soli, a następnie wykrztuszenie płwociny do sterylnej plastikowej pojemnika. Po każdym 5-minutowym cyklu wykonywano spirometrię oraz dokonywano pomiaru saturacji. W przypadku obniżenia FEV₁ o co najmniej 20% lub pojawienia się objawów nietolerancji (duszność, napady kaszlu, świszczący oddech, uczucie ucisku w klatce piersiowej) przerywano badanie.

Opracowanie płwociny

Materiał uzyskany w wyniku indukowania płwociny opracowywano według metody opisanej przez Popov i wsp. [25]. Płwocinę poddawano dalszemu badaniu niezwłocznie po zakończeniu indukcji, zawsze w ciągu 2 godzin od pobrania. Po przeniesieniu płwociny na szalkę Petriego wybierano do dalszego badania gęste i lepkie porcje śluzu, które przenoszono do 15 ml stożkowej probówki i ważono. Następnie przygotowywano roztwór dithiothreitolu (DDT; Sputolysin® Reagent; Calbiochem, Niemcy), uzyskany poprzez zmieszanie 1 części gotowego preparatu z 9 częściami wody destylowanej i dodawano do płwociny w objętości 4-krotnie większej (w μl) w stosunku do masy wyselekcjonowanych porcji płwociny (w mg). Próbkę mieszało mechanicznie za pomocą pipety poprzez kilkakrotną aspirację, a następnie inkubowano na kołyszce laboratoryjnej w temperaturze 22°C przez 15 minut. Zawiesinę filtrowano przez 40 μm nylonowe sitko (Falcon, Becton Dickinson, Stany Zjednoczone), a następnie liczone całkowitą liczbę komórek w komorze Bürkera. Żywotność oceniano poprzez zmieszanie 380 μl błękitu trypanu z 20 μl zawiesiny płwociny i wyrażano w procentach. Po odwirowaniu przez 10 minut z prędkością $500 \times g$ zbierano nadsącz, a komórki zawieszano w buforowanej soli fizjologicznej (PBS, *phosphate buffered saline*), tak aby uzyskać stężenie 1×10^6 komórek/ml. Następnie wykonywano 4 cytopreparaty, dodając do każdego cytopspinu 60 μl , barwiono jeden z nich metodą May-Grünwald-Giemsa i oceniano skład procentowy komórek poprzez liczenie 400 komórek jednojądrowych w preparacie z pominięciem komórek nabłonka płaskiego. Przyjęto, że preparat nadaje się do oceny, jeśli odsetek komórek płaskonabłonkowych nie przekraczał 20%, a żywotność była większa niż 70% [12].

Ocena fenotypu limfocytów T w indukowanej płwocinie

Analizę subpopulacji limfocytów T przeprowadzano metodą cytometrii przepływowej w aparacie FACSCalibur (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone) przy użyciu przeciwciał monoklonalnych TriTEST CD4/CD8/CD3 (Becton Dickinson, San Jose, Kalifornia, Stany Zjednoczone) według przepisu producenta. Zastosowany panel przeciwciał monoklonalnych pozwalał na ocenę subpopulacji następujących limfocytów: CD3 — limfocyty T, CD4 — limfocyty T pomocnicze oraz CD8 — limfocyty T cytotoksyczne. Przeciwciała anti-CD4 były sprzężone z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC), anti-CD8 z fikoerytryną (PE), natomiast

anti-CD3 z PerCP (*pyridinin chlorophyll protein*). Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina badanych komórek z mieszaniną IgG1 (FITC) + IgG1 (PE) mysich immunoglobulin odpowiednio wyznakowanych. Analizę uzyskanych parametrów morfologicznych fluorescencji badanych komórek przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego CellQuest 3.3. Bramkowanie limfocytów wykonano na podstawie obrazu mierzącego ziarnistość i wielkość komórek (FSC, SSC). Czteryście limfocytów, wykrytych na podstawie obecności antygeny CD3, uznano za minimalną wystarczającą do analizy liczbę komórek [11]. Wszystkie badania cytofluorometryczne zostały wykonane do 4 godzin od chwili pobrania materiału.

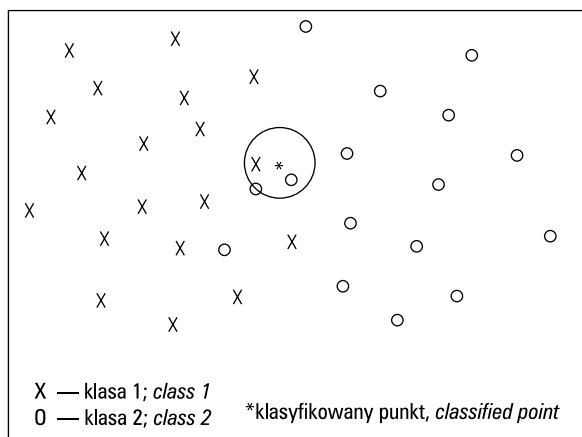
Analiza statystyczna

Poszukując wartości predykcyjnej indeksu CD4+/CD8+, dane pochodzące z badania uporządkowano w kolejności rosnącej i analizowano wszystkie możliwe wartości podziału dla indeksu CD4+/CD8+ w IP, określając dla każdej z nich czułość i specyficzność oraz częstość poprawnych rozpoznań.

Analizując możliwość ustalenia rozpoznania na podstawie parametrów indukowanej płwociny, zastosowano metody rozpoznawania obiektów wykorzystujące regułę „k-najbliższych sąsiadów” (*k-NS [k-NN, k-nearest neighbours]*) [26]. Pozwala ona na zakwalifikowanie obiektu (przypadku, pacjenta) do jednej z klas (jednostka chorobowa) reprezentowanych w zbiorze obiektów już poklasyfikowanych, zwanych zbiorem odniesienia (lub uczącym). Nowy klasyfikowany obiekt porównywany jest z obiektami każdej z klas w zbiorze odniesienia. Ścisłej mówiąc, wybieramy w zbiorze odniesienia pewną liczbę (*k*) obiektów najbardziej podobnych do niego. Wartość *k* ustalana jest eksperymentalnie tak, aby prawdopodobieństwo mylnego zaklasyfikowania było jak najmniejsze. Nowemu obiektowi zostaje przypisana klasa, która jest najliczniej reprezentowana wśród tych wybranych *k* obiektów. Działanie tej reguły dla *k* = 3 i sztucznego małego dwuwymiarowego zbioru odniesienia zilustrowano na rycinie 1 (nowy obiekt oznaczony na rycinie jako gwiazdka zostanie zaliczony do klasy kółek). Podobieństwo obiektów w tej regule mierzymy odległością — bliskie obiekty to obiekty podobne, stąd nazwa reguły.

Wyniki

Ocena płwociny była możliwa u 33 (56%) spośród 59 pacjentów zakwalifikowanych do badania. W grupie chorych na SWP analiza płwociny była możli-



Rycina 1. Ilustracja reguły k-NS dla k = 3 (opis w tekście)

Figure 1. k-NN rule for k = 3 (description in the text)

wa u wszystkich badanych osób, natomiast w grupie chorych na sarkoidozę odpowiednią do badania próbkę płwociny wykrztusiło 15 na 36 pacjentów (42%), a w grupie chorych na AZPP 11 na 16 pacjentów (69%). Analiza indukowanej płwociny nie była możliwa u 26 pacjentów z następujących powodów: 16 pacjentów nie wykrztusiło płwociny do badania, w 1 przypadku obecne były jedynie niediagnostyczne szczątki komórek w preparatach, u 7 pacjentów stwierdzono powyżej 20% komórek nabłonka płaskiego w preparacie, w 1 przypadku po zabarwieniu preparatu cytopspinowego nie stwierdzono komórek w preparacie oraz w 1 przypadku niemożliwa była analiza subpopulacji limfocytów T w cytometrycznym przepływowym z powodu zbyt małej liczby limfocytów.

Skład odsetkowy komórek i subpopulacje limfocytów T oraz indeks CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie u chorych na sarkoidozę, AZPP i SWP przedstawiono w tabeli 1.

Wartości indeksu CD4+/CD8+ pochodzące z badania indukowanej płwociny uporządkowano

od najmniejszej do największej. Następnie analizowano wszystkie możliwe wartości podziału dla indeksu CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie (dla 33 przypadków jest ich 32), określając dla każdej z nich czułość i specyficzność oraz częstość poprawnych rozpoznań (ryc. 2). Ostatecznie wybrano wartość 2,61, która oferowała najmniejszą częstość pomyłek. Dla wartości indeksu CD4+/CD8+ powyżej 2,61, 75% przypadków zaklasyfikowano jako sarkoidozę, a 25% jako inne choroby z czułością 100% i specyficznością 72,2%. Korzystając z progu wartości indeksu CD4+/CD8+ wynoszącego 2,61 i diagnozując tych pacjentów, którzy przekroczyli ten próg jako chorych na sarkoidozę, a tych którzy nie przekroczyli, jako chorych na AZPP lub SWP, prawidłowe rozpoznanie zostałyby postawione w 84,4% przypadków. W tabeli 2 przedstawiono czułość i specyficzność oraz oszacowane prawdopodobieństwo poprawnego rozpoznania dla różnych wartości indeksu CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie w diagnostyce sarkoidozy.

Analizując możliwość ustalenia rozpoznania na podstawie parametrów indukowanej płwociny zastosowano metody rozpoznawania obiektów wykorzystujące regułę k-NS. Badany zbiór zastosowany do skonstruowania klasyfikatora (reguły decyzyjnej) zawierał 33 chorych oraz 10 cech, będących parametrami indukowanej płwociny (1 — żywotność komórek w płwocinie, 2 — całkowita liczba komórek, 3 — odsetek makrofagów, 4 — odsetek limfocytów, 5 — odsetek neutrofilów, 6 — odsetek eozynofili, 7 — odsetek limfocytów CD3+, 8 — odsetek limfocytów CD4+, 9 — odsetek limfocytów CD8+, 10 — indeks limfocytów CD4+/CD8+). Zbiór odniesienia zawierał 15 przypadków z pierwszej klasy (chorzy na sarkoidozę), 11 przypadków z drugiej klasy (chorzy na AZPP) oraz 7 przypadków z trzeciej klasy (chorzy na SWP). Rozpatrując możliwość ustalenia rozpoznania w oparciu o wymie-

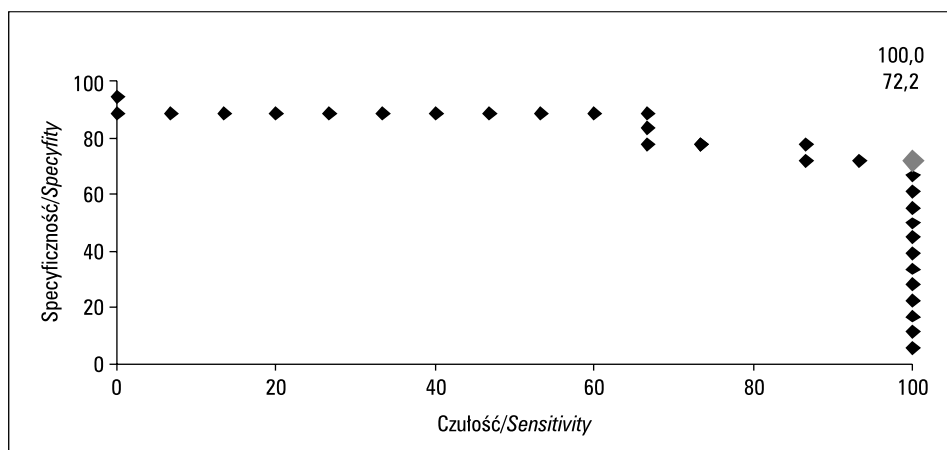
Tabela 1. Skład procentowy komórek i subpopulacje limfocytów T oraz indeks CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie w poszczególnych grupach chorych (sarkoidoza, alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych — AZPP i samoistne włóknienie płuc — SWP)

Table 1. Differential cell counts, T-lymphocyte subsets and CD4+/CD8+ ratio in induced sputum (IS) in the study subgroups (sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis — HP, idiopathic pulmonary fibrosis — IPF)

Grupa/Group	CLK × 10 ⁶	Makrofagi Macrophages	Neutrofile Neutrophils	Limfocyty Lymphocytes	Eozynofile Eosynophils	CD4	CD8	CD4/CD8
Sarkoidoza Sarcoidosis	7,4 ± 10,2	45,8 ± 24,8	36,2 ± 28,2	15,7 ± 13,4	2,2 ± 2,4	76,8 ± 14,0	14,1 ± 5,8	6,2 ± 2,6
AZPP/HP	8,4 ± 7,7	38,5 ± 20,8	38,8 ± 33,1	20,7 ± 15,4	2,0 ± 2,9	46,8 ± 25,3	32,7 ± 17,6	4,9 ± 8,2
SWP/IPF	4,2 ± 5,3	51,7 ± 27	30,4 ± 34	15,8 ± 11,5	2,1 ± 3,7	53,7 ± 21,2	33,3 ± 14,1	2,2 ± 1,8

Dane wyrażone są jako średnie ± odchylenie standardowe/Values are mean ± standard deviation (SD)

CLK (total cell count) — całkowita liczba komórek; AZPP (HP, hypersensitivity pneumonitis) — alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych; SWP (IPF, idiopathic pulmonary fibrosis) — samoistne włóknienie płuc



Rycina 2. Zależność specyficzności od czułości dla indeksu CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie; punkt oznaczony kolorem szarym odpowiada maksymalnej częstości poprawnych decyzji (czułość — 100%, specyficzność — 72,2%)

Figure 2. Dependence between specificity and sensitivity for CD4+/CD8+ ratio in induced sputum; grey point on the plot correspond with cutpoint of maximum probability of correct decisions (sensitivity — 100%, specificity — 72,2%)

Tabela 2. Czułość i specyficzność indeksu CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie w diagnostyce sarkoidozy

Table 2. Sensitivity and specificity of different values of the CD4+/CD8+ ratio in induced sputum in the diagnosis of sarcoidosis

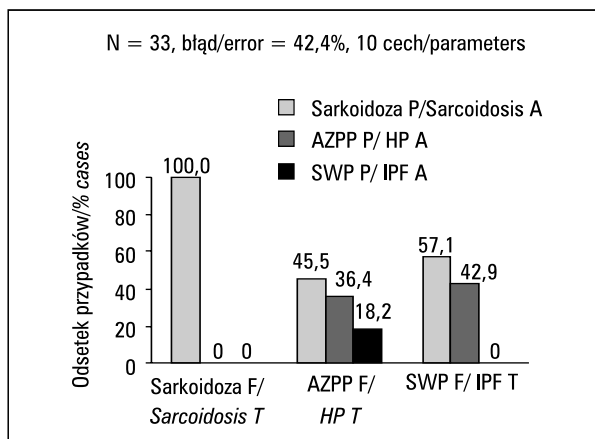
Indeks CD4+/CD8+ CD4+/CD8+ ratio	Czułość (%) Sensitivity (%)	Specyficzność (%) Specificity (%)	Częstość poprawnych rozpoznań (%) Probability of correct diagnosis (%)
1,08	100	44,4	69,7
2,61	100	72,2	84,4
3,55	86,7	77,8	81,8
5,26	66,7	88,9	78,8
7,29	33,3	88,9	63,6
10,23	6,7	88,9	51,5

nione 10 cech indukowanej płwociny, stwierdzono stosunkowo dobrą wykrywalność sarkoidozy (ryc. 3). Należy jednak stwierdzić, że znaczący odsetek chorych na alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych i samoistne włóknienie płuc również zostałaby zaklasyfikowany mylnie do grupy chorych na sarkoidozę. Klasyfikator skonstruowany na podstawie dostępnych danych klasyfikowałby bowiem wszystkich pacjentów chorych na sarkoidozę poprawnie, ale 45,45% pacjentów chorych na AZPP byłoby mylnie zaliczonych do klasy 1, czyli do chorych na sarkoidozę. Natomiast żaden z pacjentów chorych na SWP nie byłby zaklasyfikowany poprawnie, bo 57,14% z nich byłoby zaliczonych do klasy 1 (chorych na sarkoidozę), a 42,86% do klasy 2, czyli do chorych na AZPP. Na podstawie reguły k-NS działającej na podstawie 10 cech, prawidłowe rozpoznanie zostałaby ustalone w 58% przypadków (w 42% zostałaby podjęta mylna decyzja o rozpoznaniu).

W przypadku uwzględnienia w rozważaniach tylko 2 klas, to znaczy gdy zbiór odniesienia zawiera 15 przypadków z pierwszej klasy (chorzy na sarkoidozę) oraz 18 przypadków z drugiej klasy (chorzy na AZPP lub SWP), klasyfikator skonstruowany na podstawie wszystkich 10 cech klasyfikowałby prawidłowo 11 na 15 chorych na sarkoidozę — 27% chorych na sarkoidozę byłoby mylnie zaliczonych do klasy drugiej. Natomiast 17% pacjentów chorych na AZPP lub SWP byłoby mylnie zaklasyfikowanych do grupy chorych na sarkoidozę (ryc. 4). Oszacowany błąd klasyfikacji wyniósłby $e = 21\%$, to znaczy prawidłowe rozpoznanie zostałaby ustalone w 79% przypadków.

Omówienie

Określając znaczenie indeksu CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie w różnicowaniu sarkoido-

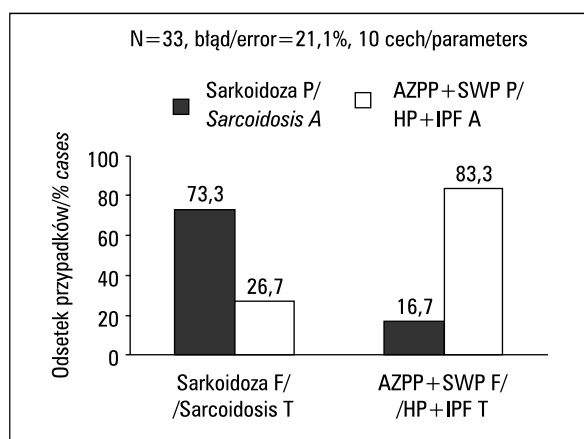


Rycina 3. Klasyfikacja chorych na choroby śródmiąższowe płuc na podstawie wszystkich parametrów indukowanej płwociny (3 klasy, reguła k-NS): odsetek przypadków z klasy F (klasa faktyczna) przyporządkowanych do klasy P (klasa przypisana)

Figure 3. Classification of the patients with interstitial lung diseases on the basis of all the parameters of induced sputum (IS) (3 classes, k-NN rule): percentage of cases from the class T (true class) qualified to the class A (assigned class)

zy od innych chorób śródmiąższowych płuc w przeprowadzonym przez autorów niniejszej pracy badaniu, poszukiwano najlepszej wartości progowej i ostatecznie wybrano wartość tego wskaźnika powyżej 2,6, bowiem oferowała ona najmniejszą częstość pomyłek diagnostycznych. Korzystając z progu wartości indeksu CD4+/CD8+ wynoszącego 2,6 i diagnozując tych pacjentów, którzy przekroczyli ten próg jako chorych na sarkoidozę, a tych którzy nie przekroczyli jako chorych na AZPP lub SWP, prawidłowe rozpoznanie zostałyby ustalone w 84,4% przypadków z czułością 100% i specyficznością 72%. Fireman i wsp. [8], porównując skład komórkowy indukowanej płwociny i BALF od chorych na różne choroby śródmiąższowe płuc, stwierdzili, że wskaźnik CD4+/CD8+ powyżej 2,5 w indukowanej płwocinie charakteryzował się wysoką wartością predykcji wyników dodatnich (81,2%), 100-procentową czułością oraz 81-procentową specyficznością w różnicowaniu sarkoidozy od innych nieziarniniakowych chorób śródmiąższowych płuc. Po raz pierwszy wykazano wówczas, że indukowana płwocina jest skuteczną, nieinwazyjną metodą, która może służyć do rozpoznania zapalenia zależnego od nagromadzenia limfocytów CD4+, co odróżnia sarkoidozę od innych nieziarniniakowych śródmiąższowych chorób płuc.

Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań, oceniających rolę indukowanej płwociny w różnicowaniu chorób śródmiąższowych płuc, wnoszą wkład w toczącą się od lat dyskusję na temat zna-



Rycina 4. Klasyfikacja chorych na sarkoidozę i pozostałe choroby śródmiąższowe płuc na podstawie wszystkich parametrów indukowanej płwociny (2 klasy, reguła k-NS): odsetek przypadków z F (klasa faktyczna) przyporządkowanych do klasy P (klasa przypisana)

Figure 4. Classification of the patients with sarcoidosis and remaining interstitial lung diseases on the basis of all the parameters of induced sputum (IS) (2 classes, k-NN rule): percentage of cases from the class T (true class) qualified to the class A (assigned class)

czenia indeksu limfocytów CD4+/CD8+ w diagnostyce sarkoidozy. Wyniki pracy autorów niniejszego artykułu, podobnie jak publikacja Fireman i wsp. [8], potwierdzają przydatność badania indukowanej płwociny w różnicowaniu sarkoidozy i innych chorób śródmiąższowych płuc, wspierając rezultaty badań między innymi Costabela i wsp. [27] i Winterbauera i wsp. [19], mówiące o ponad 90-procentowej swoistości i 50-60-procentowej czułości wysokiego współczynnika CD4+/CD8+. Natomiast pozostają w sprzeczności z tymi, którzy twierdzą, że wśród chorych na sarkoidozę występuje duża zmienność wskaźnika CD4+/CD8+ [28]. Na podstawie ostatnio opublikowanych doświadczeń Fireman i wsp. [29] rozpatrują możliwość wykorzystania indeksu limfocytów CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie w połączeniu z parametrami badań czynnościowych układu oddechowego w celu zróżnicowania sarkoidozy od innych chorób śródmiąższowych płuc. Autorzy analizują badanie, do którego włączono 120 pacjentów (67 chorych na sarkoidozę i 53 na inne choroby śródmiąższowe płuc), u których wykonano bronchoskopię z płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym i biopsją przezoskrzelową, indukcję płwociny oraz TKWR. W celu określenia prawdopodobieństwa rozpoznania sarkoidozy zastosowano dwa modele wieloczynnikowej regresji logistycznej: model I zawierał dane demograficzne i parametry indukowanej płwociny, model II obejmował dane demograficzne i kombinację parametrów indukowanej płwociny i wyników badań czynnościowych układu od-

dechowego. Dla parametrów indukowanej płwociny pole pod krzywą wyniosło 0,899, natomiast dla kombinacji parametrów indukowanej płwociny i badań czynnościowych — 0,914, dowodząc, że taki nieinwazyjny sposób postępowania może cechować się wysoką specyficznością i czułością w diagnostyce różnicowej sarkoidozy.

Indukowana płwocina jako nieinwazyjna metoda oceny subpopulacji limfocytów T mogłaby być ważnym narzędziem diagnostycznym wśród chorych, u których rozpoznano zapalenie błony naczyniowej oka i nie stwierdzono cech ewidentnego zajęcia układu oddechowego. Neudorfer i wsp. [30], badając 17 pacjentów, u których wykryto zapalenie błony naczyniowej oka o nieustalonej etiologii wykazali, że u 7 z nich oprócz podwyższonej aktywności enzymu konwertującego angiotensynę (ACE, *angiotensin-converting enzyme*) w surowicy stwierdzono wysoką wartość wskaźnika CD4+/CD8+ w indukowanej płwocinie, co mogłoby sugerować rozpoznanie sarkoidozy. Wymiana limfocytów zachodząca między przestrzenią oskrzelowo-pęcherzykową a blaszką właściwą błony śluzowej oskrzeli wskazuje na możliwość gromadzenia się limfocytów CD4+ w wydzielinie oskrzelowej, a zatem uzyskania ich poprzez indukcję płwociny [31]. W sarkoidozie i AZPP limfocyty wykazują zwiększoną ruchliwość, co mogłoby oczywiście ułatwić ich akumulację w nabłonku dróg oddechowych, prowadząc do tworzenia się ziarniniaków [32].

Analizując możliwość ustalenia rozpoznania na podstawie 10 cech indukowanej płwociny stwierdzono stosunkowo dobrą wykrywalność sarkoidozy, bowiem wszyscy pacjenci zostali zaklasyfikowani prawidłowo. Jednak należy stwierdzić, że tylko 36% chorych na AZPP zostałyby zaklasyfikowane prawidłowo, bowiem 45% chorych na AZPP byłoby mylnie zaliczonych do klasy 1, to jest do chorych na sarkoidozę, a 18% do klasy 3, czyli do chorych na SWP. Natomiast żaden z pacjentów chorych na SWP nie byłby zaklasyfikowany poprawnie, czego można było oczekiwać, skoro wiadomo, że skład komórek w BALF również nie ma cech specyficznych dla tej choroby.

Wynik badania BAL nie ma jednoznacznej wartości diagnostycznej w odniesieniu do SWP, natomiast służy do wykluczenia zakażeń i nowotworów, a także tych postaci chorób śródmiąższowych, dla których BAL ma moc diagnostyczną (np. proteinozy pęcherzyków płucnych, ziarniniakowości z komórek Langerhansa) [24]. Podobnie w przypadku indukowanej płwociny nie oczekuje się, że ta metoda oceny składników komórkowych i pozakomórkowych, pochodzących przede wszystkim

z dużych oskrzeli, stanowiłaby podstawę do rozpoznania SWP. Natomiast w odniesieniu do sarkoidozy i AZPP obecność charakterystycznego wzoru odsetkowego komórek i zaburzenia składu subpopulacji limfocytów T w płynie z BAL mogą przemawiać za określonym rozpoznaniem klinicznym w przypadku braku biopsji płuca [16, 18].

Analizując trzy grupy chorych na podstawie reguły k-NS, działającej na podstawie 10 cech indukowanej płwociny, w 42% zostałaby podjęta mylna decyzja o rozpoznaniu. Mniejszy błąd klasyfikacji zostałby popełniony w przypadku uwzględnienia w rozważaniach, podobnie jak w badaniu Fireman i wsp. [8], podziału na dwie grupy (tj. sarkoidoza *v.* pozostałe choroby śródmiąższowe). Wówczas klasyfikator skonstruowany na podstawie wszystkich 10 cech stwarza możliwość podjęcia błędnej decyzji tylko w 21% przypadków.

Jak dotychczas jest to pierwsze badanie, w którym podjęto próbę diagnostyki różnicowej trzech najczęstszych wśród chorób śródmiąższowych jednostek na podstawie parametrów indukowanej płwociny przy wykorzystaniu statystycznej metody rozpoznawania obiektów opartej na regule k-NS. Drent i wsp. [33] na podstawie innej statystycznej metody — wieloczynnikowej regresji logistycznej — stworzyli komputerowy program, dzięki któremu na podstawie wyników badania BALF (odzysk, całkowita liczba komórek, odsetek makrofagów, limfocytów, neutrofilów i eozynofilów) byli w stanie prawidłowo zaklasyfikować 91% chorych na sarkoidozę, AZPP lub SWP ze zbioru odniesienia oraz 94,5% z niezależnego zbioru testującego, który stanowili pacjenci z innego szpitala. Niewątpliwie były to lepsze wyniki od uzyskanych w niniejszej pracy, ponieważ nawet wyodrębnienie tylko dwóch grup pacjentów (chorych na sarkoidozę i inne choroby śródmiąższowe płuc) pozwoliło na podstawie wszystkich cech indukowanej płwociny prawidłowo zaklasyfikować 79% przypadków. We wspomnianym badaniu grupa pacjentów stanowiąca zbiór uczący (odniesienia) składała się ze znacznie większej liczby chorych (277 chorych) niż w niniejszym badaniu (33 chorych), co mogło wpłynąć na jakość uzyskanych wyników. W diagnostyce chorób śródmiąższowych płuc na podstawie parametrów indukowanej płwociny w badaniu autorów niniejszego artykułu lub BALF w pracy Drent i wsp. [33] zastosowano inne metody analizy statystycznej wyników. Ponadto obie metody oceny składników komórkowych w układzie oddechowym badają materiał pochodzący z nieco odmiennych obszarów płuc, stąd być może

ocena indukowanej płwociny wypadła mniej korzystnie niż analiza BALF w diagnostyce wyżej wymienionych chorób śródmiąższowych płuc. Niewątpliwie w odniesieniu do analizowanej przez autorów niniejszej pracy grupy chorych konieczne byłoby przeprowadzenie badania w większej grupie pacjentów i weryfikacja wyników na niezależnym zbiorze testującym.

Zarówno w badaniu Drent i wsp. [33], jak i autorów niniejszej pracy, możliwość różnicowania poszczególnych jednostek chorobowych oceniano na zbiorze składającym się jedynie z trzech schorzeń: sarkoidozy, AZPP i SWP i stąd program komputerowy stworzony na podstawie uzyskanych wyników ma pewne ograniczenia i powinien być stosowany z ostrożnością. W jaki sposób na dokładność diagnostyczną wpłynęłoby włączenie do analizy innych chorób śródmiąższowych płuc (np.: organizującego się zapalenia płuc, eozynofilowych zapaleń płuc, ostrego śródmiąższowego zapalenia płuc, zmian śródmiąższowych płuc w przebiegu chorób układowych tkanki łącznej) obecnie nie wiadomo i powinno to zostać zbadane.

Wnioski

Wyniki prezentowanego badania wskazują, że w różnicowaniu sarkoidozy od AZPP i SWP analiza jedynie indeksu CD4+/CD8+ wiąże się z wyższym prawdopodobieństwem ustalenia prawidłowego rozpoznania niż zastosowanie metody klasyfikacji obiektów opartej na regule k-NS wykorzystującej wszystkie parametry indukowanej płwociny. Niewątpliwie w celu potwierdzenia tych wyników wskazane wydaje się prowadzenie dalszych badań oceniających znaczenie metody indukowanej płwociny w diagnostyce sarkoidozy i innych chorób śródmiąższowych płuc w większych niż w obecnym badaniu grupach chorych.

Badanie sfinansowano z tematu naukowego nr 7 w ramach zadań badawczych Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc.

Piśmiennictwo

- 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.
- Green R.H., Brightling C.E., Woltmann G., Parker D., Wardlaw A.J., Pavord I.D. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002; 57: 875–879.
- Peleman R.A., Ryttilä P.H., Kips J.C., Joos G.F., Pauwels R.A. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 839–843.
- Ryttilä P., Metso T., Petäys T. i wsp. Eosinophilic airway inflammation as an underlying mechanism of undiagnosed prolonged cough in primary healthcare patients. *Respir. Med.* 2002; 96: 52–58.
- Fireman E., Lerman Y. Induced sputum in occupational lung diseases. *Breathe* 2005; 2: 51–59.
- Chmielowiec B., Obojski A., Barczyk A. i wsp. Wskazówki metodologiczne Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc odnośnie do wykonywania i oceny płwociny indukowanej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 378–395.
- Antoniou K.M., Alexandrakis M., Tzanakis N. i wsp. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage fluid in the evaluation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 2005; 72: 32–38.
- 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.
- D'Ippolito R., Chetta A., Foresi A. i wsp. Induced sputum and bronchoalveolar lavage from patients with hypersensitivity pneumonitis. *Respir. Med.* 2004; 98: 977–983.
- D'Ippolito R., Foresi A., Chetta A. i wsp. Induced sputum in patients with newly diagnosed sarcoidosis. *Chest* 1999; 115: 1611–1615.
- Moodley Y.P., Dorasamy T., Venketasamy S., Naicker V., Laloo U.G. Correlation of CD4/CD8 ratio and TNF α levels in induced sputum with bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 2000; 55: 696–699.
- Tsiligianni J., Tzanakis N., Kyriakou D., Chrysofakis G., Siafakas N., Bouros D. Comparison of sputum induction with bronchoalveolar lavage cell differential counts in patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 2002; 19: 205–210.
- Mróz R.M., Chyczewska E., Korniluk M., Stasiak-Barmuta A., Ossolińska M. Porównanie składu komórkowego indukowanej płwociny, popłuczyn oskrzelowych i płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w sarkoidozie, alergicznym zewnątrz-pochodnym zapaleniu pęcherzyków płucnych i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2002; 70: 468–477.
- Beeh K.M., Beier J., Kornmann O., Buhl R. Neutrophilic inflammation in induced sputum of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 2003; 20: 138–143.
- Costabel U. Atlas of bronchoalveolar lavage. Chapman and Hall Medical, London 1998.
- Costabel U. CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid: of value for diagnosing sarcoidosis? *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 2699–2700.
- Semenzato G., Bortowi M., Brunetta E., Agostini C. Immunology and pathophysiology. *Eur. Respir. Mon.* 2005; 32: 49–63.
- Bertorelli G., Bocchino V., Olivieri D. Hypersensitivity pneumonitis. *Eur. Respir. Mon.* 2000; 14: 120–136.
- Winterbauer R.H., Lammert J., Selland M., Wu R., Corley D., Springmeyer S.C. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest* 1993; 104: 352–361.
- Hunninghake G.W., Costabel U., Ando M. i wsp. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 1999; 16: 149–173.
- Lynch J.P., White E.S. Pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. Mon.* 2005; 32: 105–129.
- American Thoracic Society. Respiratory health hazards in agriculture. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: S1–S76.
- Hartman T.E. The HRCT features of extrinsic allergic alveolitis. *Seminars Respir. Crit. Care Med.* 2003; 24: 419–425.
- American Thoracic Society, European Respiratory Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 646–664.
- Popov T.A., Gottschalk R., Kolendowicz R., Dolovich J., Powers P., Hargreave F.E. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin. Exp. Allergy* 1994; 24: 778–783.
- Jóźwik A., Serpico S., Roli F. A parallel network of modified 1-NN and k-NN classifiers — application to remote-sensing image classification. *Pattern Recognition Letters* 1998; 19: 57–62.

27. Costabel U., Zaiss A.W., Guzman J. Sensitivity and specificity of BAL findings in sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1992; 9 (supl. 1): 211–214.
28. Kantrow S.P., Meyer K.C., Kidd P., Raghu G. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 2716–2721.
29. Fireman E., Lerman Y. Induced sputum in interstitial lung diseases. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2006; 12: 318–322.
30. Neudorfer M., Leibovitch I., Onn A., Loewenstein A., Fireman E. Induced sputum for identifying sarcoidosis in patients with uveitis. *Ophthalmology* 2002; 109: 858–861.
31. Pabst R., Tschernig T. Lymphocyte dynamics: caution in interpreting BAL numbers. *Thorax* 1997; 52: 1078–1080.
32. Ohtsuka M., Yoshizawa Y., Naitou T., Yano H., Sato T., Hasegawa S. The motility of lung lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 149: 455–459.
33. Drent M., van Nierop M.A.M.F., Gerritsen F.A., Wouters E.F.M., Mulder P.G.H. A computer program using BALF-analysis results as a diagnostic tool in interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 736–741.