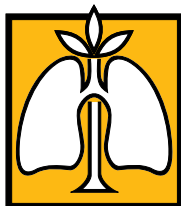
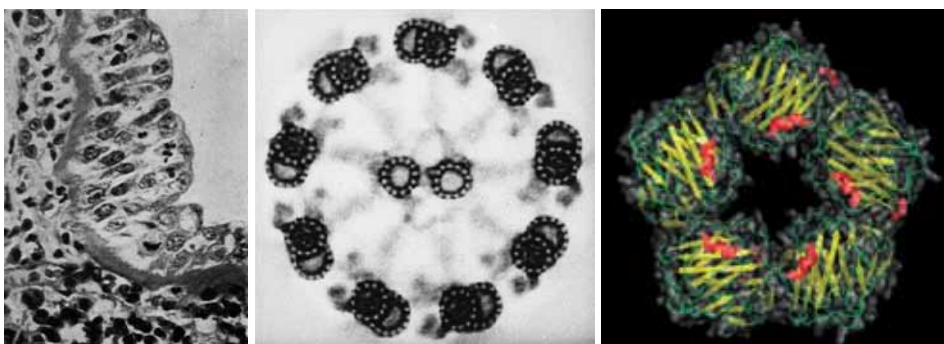


17^η ΔΙΗΜΕΡΙΔΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ



ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΕΥΧΟΣ 7

ΕΙΔΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΕΚΔΟΣΗΣ

Μ. ΑΝΘΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ - Κ. ΠΡΙΦΤΗΣ - Γ. ΣΥΡΟΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2008

17^η ΔΙΗΜΕΡΙΔΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ

ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΕΥΧΟΣ 7

ΕΙΔΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΕΚΔΟΣΗΣ

Μ. ΑΝΘΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ - Κ. ΠΡΙΦΤΗΣ - Γ. ΣΥΡΟΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2008

17^η ΔΙΗΜΕΡΙΔΑ

ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ

Αλλεργιολογικό Τμήμα Γενικού Νοσοκομείου Παίδων Πεντέλης

ΣΥΝΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ

Ελληνική Παιδοπνευμονολογική Εταιρεία

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πρόεδρος: Α. Κουμπουρλής

Μέλη: Μ. Ανθρακόπουλος

Π. Γιάλλουρος

Μ. Εμποριάδου

Χ. Κατσαρδής

Ε. Μαντζουράνη

Π. Παναγιωτοπούλου-Γαρταγάνη

Ν. Παπαδόπουλος

Σ. Πίπης

Κ. Πρίφτης

Ι. Τσανάκας

Θ. Τσιλιγιάννης

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πρόεδρος: Κ. Πρίφτης

Μέλη: Μ. Ανατολιωτάκη

Κ. Δούρος

Δ. Μερμίρη

Μ. Παπαδόπουλος

Δ.Σ. ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΟΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Πρόεδρος: Ε. Μαντζουράνη

Αντιπρόεδρος: Α. Καδίτης

Γ. Γραμματέας: Θ. Τσιλιγιάννης

Ταμίας: Π. Δουρίδας

Έφορος: Π. Παναγιωτοπούλου -
Γαρταγάνη

Στον καθηγητή κ. Θ. Καρπάθιο
που μας έχει διδάξει ιατρική σκέψη και γραφή

Εικόνες εξωφύλλου:

Αριστερά: Βιοψία βρογχικού βλενογόνου όπου παρατηρείται μιτωτική δραστηριότητα στο επιθήλιο και πάχυνση της βασικής μεμβράνης (H-E x 400) (σελίδα 126).

Κέντρο: Φυσιολογική δομή κροσσού διάταξη 9+2 (σελίδα 122).

Δεξιά: Στερεοσκοπική δομή της πρωτεΐνης CRP (σελίδα 158).

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΕΣ

A. Αττιλάκος

Λέκτορας Παιδιατρικής, Γ' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,
Πανεπιστημιακό Γενικό Αττικό Νοσοκομείο

A. Βογιατζή

Διευθύντρια, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Παίδων Πεντέλης

Γ. Βρυώνη

Λέκτορας Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

A. Bush

Professor of Paediatric Respiratory Medicine, Department of Paediatric Respiratory Medicine,
Imperial School of Medicine at National Heart and Lung Institute, Royal Brompton Hospital,
London, UK

Ε. Γαλανάκης

Επικουρος Καθηγητής Παιδιατρικής, Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

Π. Γιάλλουρος

Επιμελητής, Παιδοπνευμονολογική Μονάδα, Νοσοκομείο Αρχιεπίσκοπος Μακάριος III,
Λευκωσία, Κύπρος

Ι. Γριβέα

Λέκτορας Παιδιατρικής, Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

L. Donato

Service de Pdiatrie 2, Hautepierre, Les Htpitaux Universitaires de Strasbourg, France

Ο. Ζαφειριάδου

Ειδικευόμενη Βιοπαθολόγος, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Σισμανόγλειο Νοσοκομείο

Μ. Ζήβα-Πετροπούλου

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Παιδιατρικό Τμήμα, Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο Ασκληπιείο Βούλας

Η. Ιωσηφίδης

Ειδικευόμενος Παιδιατρικής, Γ' Παιδιατρική Κλινική Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης,
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

Ν. Καβαντζάς

Επίκουρος Καθηγητής, Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κ. Καλλέργη

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Π. & Α. Κυριακού»

Σ. Καναβάκη

Διευθύντρια, Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος «Η Σωτηρία»

Ε. Καναβάκης

Καθηγητής Πανεπιστημίου, Διευθυντής Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Μ. Κανελλοπούλου

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Σισμανόγλειο Νοσοκομείο

Γ. Κατωπόδης

Λέκτορας Παιδιατρικής, Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Α. Κουτσοκέρα

Πνευμονολογική Κλινική, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Κ. Κωστίκας

Λέκτορας Πνευμονολογίας, Πνευμονολογική Κλινική, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Σ. Λουκίδης

Λέκτορας Πνευμονολογίας, Β' Πνευμονολογική Κλινική Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Α. Μακρή

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Παίδων Πεντέλης

Ε. Μαντζουράνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

Ε. Μιχαηλίδου

Επιμελήτρια, Παιδιατρική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

Α. Μίχος

Λέκτορας Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας, Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία»

Α. Μιχούλα

Επιμελήτρια, Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Μ. Μπαρτσώτα

Ειδικευόμενη Παιδιάτρος, Παιδιατρική Κλινική, Νοσοκομείο Αρχιεπίσκοπος Μακάριος ΙΙΙ, Λευκωσία, Κύπρος

Π. Νικολαΐδου-Καρπαθίου

Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Διευθύντρια Γ' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Πανεπιστημιακό Γενικό Αττικό Νοσοκομείο

A. Πάγκαλη

Διευθύντρια, Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παιδων «Η Αγία Σοφία»

E. Παπαδοπούλη

Επιμελήτρια, Παιδιατρική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

M. Παπαδόπουλος

Επιστημονικός Συνεργάτης, Αλλεργιολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Παιδων Πεντέλης

N. Παπαδόπουλος

Λέκτορας Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας, Αλλεργιολογικό Ερευνητικό Εργαστήριο, Β' Παιδιατρική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδων «Π. & Α. Κυριακού»

Π. Πασπαλάκη

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Παιδιατρική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

K. Πρίφτης

Αναπληρωτής Διευθυντής, Αλλεργιολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Παιδων Πεντέλης

E. Ροηλίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας, Γ Παιδιατρική Κλινική Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

X.Σκευάκη

Αλλεργιολογικό Ερευνητικό Εργαστήριο, Β' Παιδιατρική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδων «Π & Α Κυριακού»

B. Σπυρόπουλος

Ειδικευόμενος Βιοπαθολόγος, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος «Η Σωτηρία»

K. Στεφανάκη

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία»

Γ. Συρογιαννόπουλος

Καθηγητής Παιδιατρικής, Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

M. Τζέτη

Λέκτορας Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

A. Τσακρής

Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

I. Τσανάκας

Καθηγητής Παιδιατρικής Πνευμονολογίας, Γ Παιδιατρική Κλινική Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκης

Λ. Τσάρτσαλη

Research Fellow, Department of Paediatric Respiratory Medicine, Imperial School of Medicine at National Heart and Lung Institute, Royal Brompton Hospital, London, UK

Θ. Τσιλιγιάννης

τ. Διευθυντής, Παιδιατρικό Τμήμα, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών

Μ. Τσολιά

Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμώξεων, Β Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων, «Π. & Α. Κυριακού»

Ο. Φιλίππου

Επιμελήτρια, Παιδιατρικό Τμήμα, Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο Ασκληπιείο Βούλας

Α. Χαρισιάδου

Αναπληρώτρια Διευθύντρια, Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία»

Ε. Χατζηαγόρου

Επιμελήτρια, Γ Παιδιατρική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	13
Αρχές Μικροσκοπησης.....	15
<i>Γ. Βρυώνη, Α. Τσακρής</i>	
Μέθοδοι αναζήτησης λοιμωδών παραγόντων.....	27
<i>Α. Χαρισιάδου, Α. Πάγκαλη</i>	
Μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης ιογενών παραγόντων	31
<i>Α. Μίχος</i>	
Εξέταση ρινοφαρυγγικού εκκρίματος	38
<i>Γ. Κατωπόδης, Γ. Συρογιαννόπουλος</i>	
Ανίχνευση και αξιολόγηση μυκήτων	47
<i>Η. Ιωσηφίδης, Ε. Ροηλίδης</i>	
Μικροβιολογική διάγνωση φυματίωσης στα παιδιά	55
<i>Σ. Καναβάκη, Β. Σπυρόπουλος</i>	
Νεότερες ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι στη διάγνωση της φυματίωσης.....	64
<i>Μ. Τσολιά</i>	
Κυτταρικά στοιχεία και δείκτες φλεγμονής σε προκλητά πτύελα.....	71
<i>Λ. Τσαρτσάλη, Α. Bush</i>	
Καλλιέργεια Πτυέλων	80
<i>Μ. Κανελλοπούλου, Ο. Ζαφειριάδου</i>	
Καλλιέργεια βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος.....	88
<i>Α. Μακρή, Α. Βογιατζή</i>	
Κυτταρολογική ανάλυση βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος στα παιδιά	99
<i>Μ. Παπαδόπουλος, Κ. Τσακανίκα, Κ. Πρίφτης</i>	
Αναζήτηση ιών στο κατώτερο αναπνευστικό	111
<i>Χ. Σκευάκη, Ν. Παπαδόπουλος</i>	
Βιοψία και ξέσματα ρινικού βλεννογόνου.....	119
<i>Μ. Μπαρτσώτα, Π. Γιάλλουρος</i>	
Βιοψία βρογχικού βλεννογόνου	125
<i>Ν. Καβαντζάς</i>	
Διαδερμική (διαθωρακική) παρακέντηση πνεύμονα.....	129
<i>Ε. Γαλανάκης</i>	

Βιοψία πνεύμονα	133
<i>Θ. Τσιλιγιάννης, Κ. Στεφανάκη</i>	
Ανάλυση και αξιολόγηση υπεζωκοτικού υγρού	140
<i>Α. Αττιλάκος, Π. Νικολαΐδου-Καρπαθίου</i>	
Δείκτες φλεγμονής στο αίμα σε νοσήματα αναπνευστικού	150
<i>Ε. Μιχαηλίδου, Π. Πασπαλάκη, Ε. Παπαδοπούλη, Ε. Μαντζουράνη, L. Donato</i>	
Αναζήτηση λοιμωδών παραγόντων στο αίμα και στα ούρα	162
<i>Ι. Γριβέα, Α. Μιχούλα</i>	
Ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης λοιμωδών παραγόντων	169
<i>Κ. Καλλέργη</i>	
Συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα	180
<i>Α. Κουτσοκέρα, Κ. Κωστίκας, Σ. Λουκίδης</i>	
Εκπνεόμενο μονοξειδίο του αζώτου	190
<i>Ε. Χατζηαγόρου, Ι. Τσανάκας</i>	
Αλλεργιολογικός έλεγχος	202
<i>Μ. Ζήβα-Πετροπούλου, Ο. Φιλίππου</i>	
Μοριακή γενετική: Διάγνωση και εφαρμογές στην ιατρική	212
<i>Μ. Τζέτη, Ε. Καναβάκης</i>	

Πρόλογος

Η εντυπωσιακή πρόοδος της βιοτεχνολογίας έχει φέρει νέες δυνατότητες εργαστηριακού ελέγχου στην κλινική πράξη. Η εφαρμογές που προσφέρονται σε κάθε πεδίο είναι πολλές και η ταχύτητα με την οποία εμφανίζονται η μια μετά την άλλη είναι μεγάλη. Η υιοθέτηση των νέων εφαρμογών στην ιατρική πράξη όμως, πολύ περισσότερο την παιδιατρική, προϋποθέτει ορθή επιλογή, ορθή εκτέλεση και ορθή ερμηνεία του αποτελέσματος.

Ο κλινικός γιατρός που στοχεύει στη σωστή διάγνωση του προβλήματος του ασθενή του, οφείλει να συστήσει τις απλούστερες και οικονομικότερες εξετάσεις, που θα ανιχνεύσουν το πρόβλημα με περισσότερη ακρίβεια και ασφάλεια. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητο να έχει ενημέρωση που να τον βοηθά στη σωστή επιλογή.

Η Παιδιατρική και οι επιμέρους εξειδικεύσεις της έχουν επιπλέον λόγο που επιβάλλει περισσότερο ευαίσθητα κριτήρια. Τα παιδιά ως οργανισμοί είναι στη φάση της αύξησης και της ανάπτυξης.

Στην προσπάθεια να αποκτήσουμε ως γιατροί σωστότερα κριτήρια και να αξιοποιούμε με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα εντυπωσιακά επιτεύγματα της σύγχρονης βιοτεχνολογίας, προβαίνουμε στην έκδοση του παρόντος τόμου. Εντάσσεται στην εκδοτική σειρά «Μονογραφίες Παιδιατρικής Πνευμονολογίας», έχει τίτλο «Ειδικές Εργαστηριακές Εξετάσεις Νοσημάτων Αναπνευστικού» και πραγματεύεται θέματα ειδικότερου ενδιαφέροντος, αλλά και γενικότερου.

Ο τρόπος με τον οποίο παρουσιάζονται τα θέματα είναι εκείνος των αυτόνομων ανασκοπήσεων. Καταβλήθηκε προσπάθεια ώστε παρά την πολυσυγγραφικότητα του βιβλίου να διατηρηθεί, στο μέτρο του εφικτού, ενιαία ορολογία.

Ως επιμελητές της Έκδοσης εκφράζουμε ειλικρινείς ευχαριστίες στους συγγραφείς που ανταποκρίθηκαν στην πρόσκλησή μας και κατέθεσαν το αποτέλεσμα της επίπονης πνευματικής τους προσπάθειας.

Ευχαριστούμε τη χορηγό φαρμακευτική εταιρεία Wyeth A.E. χωρίς την οικονομική χορηγία της οποίας δεν θα ήταν δυνατή αυτή η έκδοση. Ευχαριστούμε τέλος, τον κύριο Μ. Στεφανάκη για την τεχνική φροντίδα, την ταχύτητα και τη μεθοδικότητα με την οποία εργάστηκε.

Οι επιμελητές της έκδοσης

Μ. Ανθρακόπουλος

Κ. Πρίφτης

Γ. Συρογιαννόπουλος

Αρχές Μικροσκόπησης

Γ. Βρυώνη, Α. Τσακρής

Η ιστορία του μικροσκοπίου σχετίζεται στενά με την ιστορία της Μικροβιολογίας. Οι Hooke, Divini, Kircher και van Leeuwenhoek ήταν από τους πρώτους που περιέγραψαν μικροσκοπικές μορφές ζωής. Ο Hooke το 1665 στο έργο του «Micrographica» συμπεριέλαβε εικόνες μυκήτων, καθώς και της ανατομίας του ψύλλου. Ο Antony van Leeuwenhoek στις επιστολές του προς τη Βασιλική Εταιρεία της Αγγλίας έδινε λεπτομερείς περιγραφές πρωτόζωων και βακτηρίων. Οι ανακαλύψεις του στο μεγαλύτερο μέρος τους δημοσιεύτηκαν στο Δελτίο της Εταιρείας και η πρώτη εικονογράφηση βακτηρίων βρίσκεται σε ένα σχέδιό του στο Δελτίο του 1683.¹ Στο παρόν κεφάλαιο αναλύονται τα βασικά χαρακτηριστικά και ο τρόπος λειτουργίας των κυριότερων ειδών μικροσκοπίων που χρησιμοποιούνται στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο με σκοπό να γίνει περισσότερο κατανοητή η χρησιμότητά τους και οι εφαρμογές τους στη διαγνωστική Ιατρική.

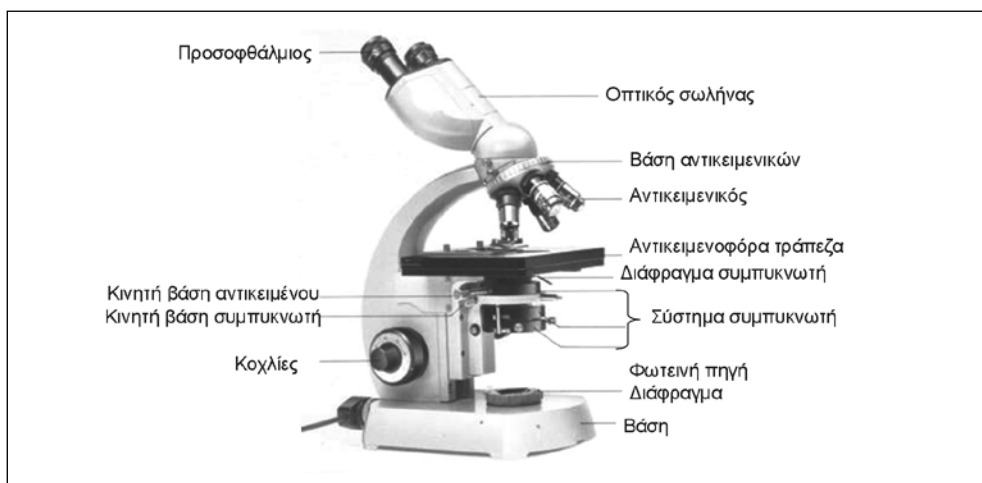
ΚΟΙΝΟ Η ΣΥΝΘΕΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Η εφεύρεσή του αποδίδεται περίπου το 1590 στους Δανούς δημιουργούς θεάματος (spectacle makers) Zaccharias και Hens Janssen. Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο περιλάμβανε ένα αντικειμενικό και ένα προσοφθάλμιο φακό που ήταν τοποθετημένοι στα άκρα ενός σωλήνα.¹

Οπτικό σύστημα και σύστημα φωτισμού

Τα σύγχρονα οπτικά (ή φωτονικά) μικροσκόπια (Εικόνα 1) αποτελούνται από το οπτικό σύστημα και το σύστημα φωτισμού.

Το **οπτικό σύστημα** διατηρεί ακόμα το γενικό σχεδιασμό των Janssen, αποτελούμενο από δύο συστήματα φακών τοποθετημένα στα άκρα ενός σωλήνα: το *αντικειμενικό* και το *προσοφθάλμιο*.¹ Το *αντικειμενικό σύστημα φακών* απαρτίζεται από σύνολο 3-4 φακών βραχύτατης εστιακής απόστασης σε περιστρεφόμενη βάση διαφορετικής μεγεθυντικής ικανότητας, από τους οποίους χρησιμοποιείται κάθε φορά ο ένας, κατά την επιθυμία του χειριστή. Αυτό παράγει πραγματικό μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου που τοποθετείται στην εστία. Το *προσοφθάλμιο σύστημα φακών* συγκροτείται συνήθως από δύο συγκεντρωτικούς φακούς και λειτουργεί ως μεγεθυντικός φακός που μετατρέπει το πραγματικό είδωλο του αντικειμενικού συστήματος σε μεγεθυμένο φανταστικό είδωλο. Αυτό παρατηρείται από τον οφθαλμό ή καταγράφεται μέσω φωτογραφικού φακού (φωτο-μικροσκόπηση).^{2,3} Η απόσταση του φωτεινού μονοπατιού μέσα από το μηχανικό σώμα του μικροσκοπίου, δηλαδή από την υποδοχή κοχλίωσης του αντικειμενικού φακού μέχρι το ανώτερο άκρο



Εικόνα 1. Κοινό ή σύνθετο μικροσκόπιο.

του προσοφθάλμιου φακού, ονομάζεται *μηχανικό μήκος του μικροσκοπίου* και είναι περίπου 160 mm.³

Ένα από τα σημαντικά σημεία του μικροσκοπίου είναι και το **σύστημα φωτισμού**. Αυτό βρίσκεται κάτω από τη βάση ή τράπεζα, πάνω στην οποία τοποθετείται το μεγεθυνόμενο αντικείμενο, και αποτελείται από μια *τεχνητή φωτεινή πηγή* (λυχνία), το *συμπυκνωτή*, το *διάφραγμα* (ίριδα) και ένα *κάτοπτρο*.³ Στο εμπόριο υπάρχουν διάφορες λυχνίες φωτισμού, αλλά η συχνότερα χρησιμοποιούμενη είναι η λυχνία 50- ή 100-W βολφραμίου – αλογόνου, εξαιτίας του χαμηλού κόστους και της μεγάλης διάρκειας ζωής της.¹ Ο συμπυκνωτής αποτελείται από μια ομάδα φακών που συλλέγουν και εστιάζουν το φως στο μεγεθυνόμενο αντικείμενο. Το διάφραγμα ρυθμίζει τη διάμετρο της φωτεινής δέσμης που προσπίπτει στο αντικείμενο.³ Ανεπαρκής φωτισμός του αντικειμένου μπορεί να ελαττώσει την αντίθεση και κατ' επέκταση τη διακριτική ικανότητα οποιουδήποτε μικροσκοπίου.¹

Η πολυπλοκότητα του οπτικού συστήματος, ιδίως του αντικειμενικού, οφείλεται στην ανάγκη επίτευξης εξαιρετικής ποιότητας ειδώλου. Η απόσταση μεταξύ αντικειμενικού και προσοφθάλμιου είναι αμετάβλητη. Για την επίτευξη της εστίασης προσεγγίζεται ή απομακρύνεται μέσω μηχανισμού υψηλής ακρίβειας το οπτικό σύνολο αντικειμενικού - προσοφθάλμιου από ή προς το παρατηρούμενο αντικείμενο ή την αντικειμενοφόρο πλάκα. Το προς παρατήρηση αντικείμενο μπορεί να είναι λεπτή διαφώτιστη δομή, τοποθετημένη πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, ή αποτύπωμα στερεής επιφάνειας ή σταγόνα υγρού απλωμένη μεταξύ καλυπτρίδας και αντικειμενοφόρου πλάκας.²

Ο αντικειμενικός φακός έχει μικρότερη εστιακή απόσταση ($F1$) από τον προσοφθάλμιο ($F2$) και σχηματίζει την εικόνα του αντικειμένου πραγματική και ανεστραμμένη στην κύρια εστία του προσοφθάλμιου. Η εικόνα αυτή χρησιμεύει σαν «μεγεθυμένο αντικείμενο» για τον προσοφθάλμιο φακό, ο οποίος σχηματίζει τελικά φανταστική εικόνα μεγαλύτερη, ανεστραμμένη και σε άπειρη απόσταση με αποτέλεσμα να μην κουράζεται ο παρατηρητής. Αυτό συμβαίνει γιατί μετά τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού το πραγματικό είδωλο τοποθετείται στην κύρια εστία του προσοφθάλμιου φακού. Μπορεί όμως το είδωλο του

αντικειμενικού φακού (ενδιάμεση εικόνα) να τοποθετηθεί μεταξύ του προσοφθάλμιου φακού και της κυρίας εστίας του. Στην περίπτωση αυτή το τελικό είδωλο σχηματίζεται στην απόσταση της ευκρινούς όρασης (25 cm) ή κοντά σε αυτή, κατά την επιθυμία του χειριστή (Εικόνα 2α και 2β).³

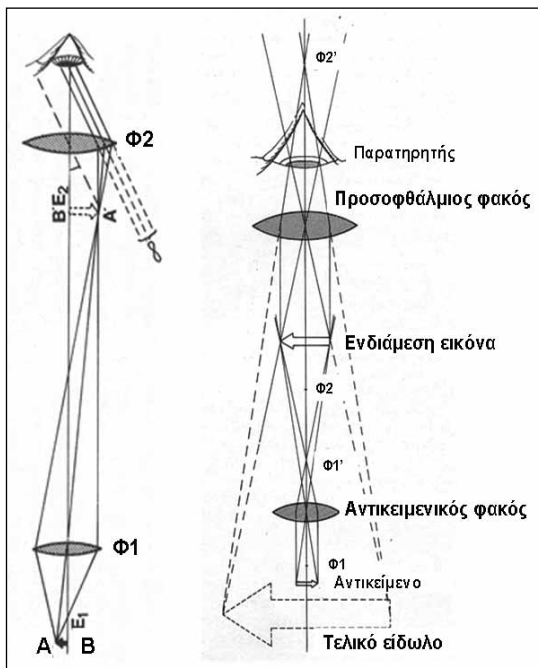
Τα στοιχεία του μικροσκοπίου

Σε ένα μικροσκόπιο τα στοιχεία που ιδιαίτερα ενδιαφέρουν είναι: η μεγέθυνση του αντικειμένου, η διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου και ο φωτισμός της παρατηρούμενης εικόνας.

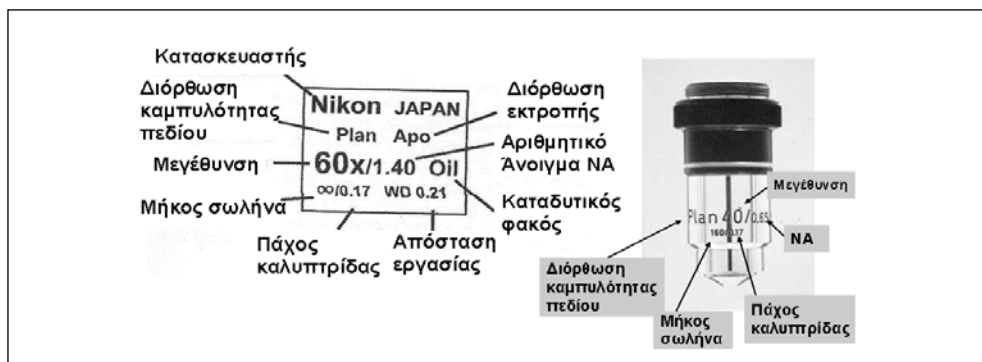
Μεγέθυνση

Μεγέθυνση είναι ο λόγος της γωνίας όρασης με την οποία φαίνεται το φανταστικό είδωλο του αντικειμένου, μετά τη μεγέθυνσή του, προς την γωνία όρασης με την οποία φαίνεται το αντικείμενο χωρίς μεγέθυνση στην ελάχιστη απόσταση της ευκρινούς όρασης των 25 cm. Επειδή όμως οι αναγραφόμενες γωνίες είναι μικρές, πρακτικά η μεγέθυνση είναι ίση με το γινόμενο της εγκάρσιας μεγέθυνσης του αντικειμενικού φακού επί την εγκάρσια μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού. Οι μεγεθύνσεις αυτές αναγράφονται πάνω στους φακούς (Εικόνα 3).^{1,3}

Η μεγέθυνση του οπτικού μικροσκοπίου έχει ένα όριο, πέρα από το οποίο αύξησή της δεν αυξάνει τις πληροφορίες που παρέχει η μεγέθυνση του αντικειμένου. Το όριο αυτό χαρακτηρίζεται ως «χρήσιμη μεγέθυνση» και προσδιορίζεται τόσο από το διακριτικό όριο του μικροσκοπίου r (βλέπε παρακάτω), όσο και από το διακριτικό όριο του οφθαλμού σύμφωνα με τον τύπο $\mu_x = \delta/r$, όπου δ το διακριτικό όριο του οφθαλμού στην απόσταση της ευκρινούς όρασης. Το διακριτικό όριο του οφθαλμού έχει καθοριστεί ως η ικανότητα να διακρίνει χωριστές παράλληλες γραμμές ή κουκίδες με την ελάχιστη απόσταση μεταξύ τους. Για την απόσταση της ευκρινούς όρασης (25 cm), φυσιολογικά η απόσταση αυτή είναι 100 μm ($\delta=0,1 \text{ mm}$ ή 1.000.000 E).



Εικόνες 2α και 2β. Σχηματική παράσταση του τρόπου λειτουργίας του κοινού οπτικού μικροσκοπίου. **1α:** Φ1 ο αντικειμενικός φακός, Φ2 ο προσοφθάλμιος φακός, Β'Α' το είδωλο του μεγεθυνόμενου αντικειμένου ΑΒ που σχηματίζεται στην κύρια εστία του προσοφθάλμιου φακού και το τελικό είδωλο γίνεται αντιληπτό σε άπειρη απόσταση. **1β:** Το είδωλο του αντικειμενικού φακού σχηματίζεται μεταξύ του προσοφθάλμιου και της κυρίας εστίας του. Το τελικό είδωλο σχηματίζεται στην απόσταση της ευκρινούς όρασης (από Προυκάκης Χ, 1983).



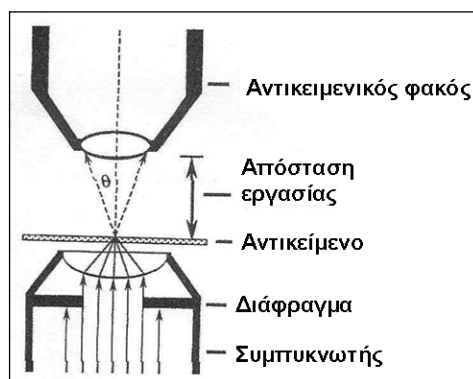
Εικόνα 3: Αναγραφόμενα στοιχεία πάνω στο αντικειμενικό φακό. Στον αντικειμενικό φακό υπάρχουν πληροφορίες του κατασκευαστή, των διορθωτικών παραγόντων, το αριθμητικό άνοιγμα (NA), το μήκος του σωλήνα, το πάχος της καλυπτρίδας, την απόσταση εργασίας και το μέσο κατάδυσης (αν χρειάζεται) (από Wiedbrauk D, 2007).

Διακριτική ικανότητα

Η διακριτική ικανότητα είναι ίση με $1/r$, όπου r το διακριτικό όριο του μικροσκοπίου. Όπως είναι γνωστό, το φαινόμενο της περίθλασης επιβάλλει ένα ελάχιστο όριο απόστασης μεταξύ δύο σημείων, κάτω από το οποίο τα είδωλά τους δεν διακρίνονται όσο και αν αυξηθεί η μεγέθυνση.² Η ελάχιστη αυτή απόσταση ή διακριτικό όριο του μικροσκοπίου δίνεται από τη σχέση $r=1,22\lambda/2 NA$, όπου λ είναι το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός, n ο δείκτης διάθλασης στο χώρο του μεγεθυνόμενου αντικειμένου και NA το γωνιακό ή αριθμητικό άνοιγμα του μικροσκοπίου.^{1,3}

Γωνιακό ή αριθμητικό άνοιγμα (numerical aperture, NA) είναι έκφραση της ικανότητας ενός φακού να συγκεντρώνει το φως. Αυτό ορίζεται ως το γινόμενο $n\sin\theta$, όπου n ο δείκτης διάθλασης στο χώρο του αντικειμένου και θ το μισό του γωνιακού ανοίγματος του φακού (γωνιακό άνοιγμα είναι η μέγιστη γωνία που σχηματίζουν οι ακτίνες που ξεκινούν από ένα φωτεινό σημείο του αντικειμένου και κατορθώνουν να εισχωρήσουν στο μικροσκόπιο). Η τιμή NA εξαρτάται από τη διάμετρο της οπής μέσα από την οποία εισέρχονται οι φωτεινές ακτίνες (Εικόνα 4).^{4,5}

Στους συνηθισμένους αντικειμενικούς φακούς η τιμή NA δεν μπορεί να υπερβεί τη μονάδα, αφού ο δείκτης διάθλασης είναι



Εικόνα 4: Τυπική σύνθεση τμημάτων του κοινού οπτικού μικροσκοπίου. Η οπτική στήλη δημιουργείται από τη φωτεινή πηγή, συμπτυκνύεται από το συμπτυκνωτή και εστιάζεται στο μεγεθυνόμενο αντικείμενο. Το διάφραγμα ρυθμίζει τη γωνία της φωτεινής δέσμης, το γωνιακό άνοιγμα (NA) του συμπτυκνωτή και το βαθμό αντίθεσης της εικόνας. Η απόσταση εργασίας είναι η κάθετη απόσταση από την κορυφή του δείγματος μέχρι το όριο του αντικειμενικού φακού. Η τιμή θ (το μισό του γωνιακού ανοίγματος του φακού) χρησιμοποιείται στον υπολογισμό του NA (βλ. κείμενο) (από Wiedbrauk D, 2007).

ίσος με 1 (δείκτης διάθλασης του αέρα 1,003) και το ημθ δεν υπερβαίνει το 1.³ Μεγαλύτερο ΝΑ και επομένως μικρότερο διακριτικό όριο επιτυγχάνεται με τη χρήση καταδυτικού αντικειμενικού φακού. Στην περίπτωση αυτή προστίθεται μια σταγόνα υγρού υψηλού δείκτη διάθλασης (συνήθως κεδρέλαιο με δείκτη διάθλασης 1,51) μεταξύ παρασκευάσματος και καταδυτικού αντικειμενικού φακού.^{2,3} Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με το σύστημα ομοιογενούς κατάδυσης, όπου ο δείκτης διάθλασης της καλυπτρίδας, του καταδυτικού υγρού και του αντικειμενικού φακού έχουν την ίδια τιμή. Έτσι το αριθμητικό άνοιγμα έχει τιμή περίπου 1,4 και το διακριτικό όριο του μικροσκοπίου με τη χρήση του καταδυτικού φακού έχει τιμή $\lambda/2,8$.³

Συνήθως οι χρησιμοποιούμενοι φακοί απορροφούν τις φωτεινές ακτίνες μεγάλου μήκους κύματος και επομένως η τελική εικόνα σχηματίζεται από τις φωτεινές ακτίνες με τα μικρότερα μήκη κύματος, λίγο μεγαλύτερα των 4000 Å. Άρα το διακριτικό όριο του κοινού μικροσκοπίου θεωρητικά δεν είναι μικρότερο από $4000/2=2000\text{Å}$ ή 0,2 μm , όταν χρησιμοποιούνται ξηροί φακοί, και όχι μικρότερο από $4000/2,8=1430\text{Å}$ ή 0,14 μm όταν χρησιμοποιείται καταδυτικός φακός. Τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα έχουν διάμετρο 0,3-1 μm . Άρα το κοινό μικροσκόπιο δεν μπορεί να κάνει ορατή την εσωτερική δομή των βακτηριακών κυττάρων, αλλά χρησιμεύει μόνο για τη μελέτη του σχήματός τους, της διάταξης των κυττάρων τους και του τρόπου που χρωματίζονται με τις διάφορες χρωστικές.

Η χρήσιμη μεγέθυνση, σύμφωνα με τον τύπο $\mu_x = \delta/r$ και τα παραπάνω δεδομένα είναι $1.000.000/2.000=500$ φορές. Επειδή όμως ο οφθαλμός κουράζεται κατά τη μικροσκόπηση στο διακριτικό όριο της ικανότητάς του, συχνά χρησιμοποιούνται μεγεθύνσεις μεγαλύτερες από τη χρήσιμη, ενώ ως τυπική μεγέθυνση αναφέρεται η μεγέθυνση 1000, αν και υπάρχουν οπτικά μικροσκόπια με δυνατότητα μεγαλύτερων τιμών μεγέθυνσης.³

Ο αντικειμενικός φακός είναι από τα σπουδαιότερα στοιχεία του μικροσκοπίου και είναι αυτός που καθορίζει την ποιότητα της εικόνας που παράγει ένα συγκεκριμένο μικροσκόπιο.⁶ Κατά την επιλογή μικροσκοπίου, πρέπει να επιλέγεται η μεγεθυντική ικανότητα, το ΝΑ και το επίπεδο διόρθωσης του κάθε αντικειμενικού φακού. Οι φακοί με το μεγαλύτερο ΝΑ έχουν την υψηλότερη ανάλυση και δημιουργούν φωτεινότερο πεδίο παρατήρησης. Συνήθως είναι τέσσερις και εναλλάσσονται, ώστε κάθε φορά να χρησιμοποιείται ένας: ο σαρωτικός (10x), ο μικρής μεγέθυνσης (20x), ο μεγάλης μεγέθυνσης (40x) και ο ελαιοκαταδυτικός φακός (100x).

Υπάρχουν διάφορα είδη αντικειμενικών φακών που στόχο έχουν την διόρθωση των οπτικών σφαλμάτων, αποτέλεσμα της απόκλισης των φωτεινών ακτίνων (εκτροπή).

Εκτροπή (Aberration) είναι η απόκλιση των φωτεινών ακτίνων όταν διέρχονται μέσα από τους φακούς, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό σε ποικίλο βαθμό ασαφών ειδώλων. Αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων στοιχείων κατά μήκος του οπτικού μονοπατιού, όπως λάδι, σκόνη ή ατελειών στο σύστημα φακών. Τα δύο κύρια είδη εκτροπής είναι η *σφαιρική εκτροπή* και η *χρωματική εκτροπή*. Αυτές συμβαίνουν αν το λευκό φως περάσει μέσα από ένα κυρτό φακό. Κατά τη *σφαιρική εκτροπή*, οι φωτεινές ακτίνες, οι προερχόμενες από ένα φωτεινό σημείο τοποθετημένο πάνω στον κύριο άξονα του φακού, δεν εστιάζονται όλες μετά τη διάθλασή τους στο ίδιο σημείο ώστε να σχηματίσουν ένα σημειακό είδωλο. Έτσι οι εικόνες είναι εστιασμένες στο κέντρο, αλλά ασαφείς στην περιφέρεια. Η *χρωματική εκτροπή* οφείλεται στην αδυναμία του φακού να εστιάσει όλες τις επιμέρους μονοχρωματικές ακτινοβολίες, από τις οποίες αποτελείται το λευκό φως, στο ίδιο επίπεδο. Επειδή ο δείκτης διάθλασης γίνεται ελάχιστος για την ερυθρά περιοχή του ορατού φάσματος, η εστιακή απόσταση ενός φακού τοποθετημένου στον αέρα θα

είναι μικρότερη για το ερυθρό ή το πράσινο χρώμα σε σύγκριση με το μπλε ή το ιώδες. Η μεγέθυνση επηρεάζεται εξαιτίας της χρωματικής εκτροπής, διαφοροποιούμενη κατά μήκος του οπτικού άξονα και κάθετα προς αυτόν.^{1,2}

Ο achromatic (achromat) αντικειμενικός φακός διορθώνει τη σφαιρική εκτροπή, ως προς το πράσινο μήκος κύματος, και τη χρωματική εκτροπή, ως προς δύο μήκη κύματος (μπλε και κόκκινο), με αποτέλεσμα να εστιάζει το μπλε και το κόκκινο στο ίδιο σημείο. Το είδος αυτό του φακού έχει τα καλύτερα αποτελέσματα, όταν το φως περνάει μέσα από πράσινο φίλτρο και όταν χρησιμοποιείται για ασπρόμαυρη φωτο-μικροσκοπηση. Πρόβλημα, επίσης, είναι η επίπεδη εμφάνιση του οπτικού πεδίου παρατήρησης γιατί είναι εστιασμένο στο κέντρο, αλλά όχι στην περιφέρεια. Ο planachromat (Plan) φακός διορθώνει την καμπυλότητα του πεδίου. Οι F-achromat και A-plan φακοί είναι ημιεπίπεδοι φακοί. Το επόμενο μεγαλύτερο επίπεδο διόρθωσης το επιτυγχάνει ο καλούμενος fluorite ή semi-apochromat φακός. Ο fluorite φακός δημιουργείται από υψηλής ποιότητας σύστημα κρυστάλλων, που μειώνουν στο ελάχιστο την οπτική εκτροπή. Όπως ο achromat φακός, ο fluorite διορθώνει τη χρωματική εκτροπή ως προς το κόκκινο και μπλε φως, αλλά τη σφαιρική εκτροπή ως προς δύο ή τρία χρώματα, αντί για ένα. Συγκριτικά με τον achromat φακό, ο fluorite επιτυγχάνει καλύτερη διόρθωση των σφαλμάτων, παράγει φωτεινότερη εικόνα, έχει καλύτερη διακριτική ικανότητα και δημιουργεί μεγαλύτερο βαθμό αντίθεσης, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έγχρωμη φωτο-μικροσκοπηση με λευκό φως. Ο φακός με τη μεγαλύτερη δυνατότητα διόρθωσης από όλα τα προηγούμενα είδη είναι ο apochromat αντικειμενικός φακός. Αυτός διορθώνει τη χρωματική εκτροπή, ως προς τρία χρώματα (κόκκινο, πράσινο και μπλε), με αποτέλεσμα να την εξαλείφει σχεδόν πλήρως, και παράλληλα διορθώνει τη σφαιρική εκτροπή, ως προς δύο ή τρία μήκη κύματος. Το είδος αυτό είναι η καλύτερη επιλογή για φωτο-μικροσκοπηση με λευκό φως, ενώ, για δεδομένη τιμή μεγέθυνσης, έχει το μεγαλύτερο NA σε σχέση με τους achromat και fluorite φακούς. Ο plan-apochromat φακός έχει άριστη διόρθωση χρωμάτων, μέγιστο NA και πλατύ οπτικό πεδίο παρατήρησης.^{1,4-7}

Οι προσοφθάλμιοι φακοί προκαλούν μεγέθυνση του ειδώλου που έρχεται από τον αντικειμενικό φακό. Η μεγεθυντική ικανότητά τους είναι από 5x έως 20x (συχνότερα χρησιμοποιούνται οι φακοί με μεγεθυντική ικανότητα 10x ή 12,5x). Η θέση τους στο διόφθαλμο μικροσκόπιο μπορεί να αλλάξει, ώστε να συμπίπτει με τη διακορική απόσταση του παρατηρητή, ενώ σε ορισμένα μικροσκόπια μπορούν να εστιαστούν ανεξάρτητα. Ως εξαρτήματα μπορεί να φέρουν μικρο-μετρική κλίμακα και δυνατότητα φωτο-μικροσκοπησης. Οι "plan" ή "planos" προσοφθάλμιοι φακοί διορθώνουν την καμπυλότητα του οπτικού πεδίου, με αποτέλεσμα το είδωλο να είναι συγχρόνως εστιασμένο από το κέντρο προς την περιφέρεια του οπτικού πεδίου. Οι «ευρέος πεδίου» φακοί είναι κατάλληλοι για παρατεταμένη μικροσκοπηση, ενώ, τέλος, υπάρχουν ειδικοί προσοφθάλμιοι φακοί για διοπτροφόρους, με τους οποίους το είδωλο σχηματίζεται σε κάποια απόσταση.⁷

Βάθος πεδίου (depth of field) είναι η περιοχή μπροστά και πίσω από το αντικείμενο όπου υπάρχει αποδεκτή εστίαση. Αυτή εξαρτάται ανάλογα με το μήκος κύματος και αντιστρόφως ανάλογα με το NA. *Βάθος εστίασης (depth of focus)* είναι η απόσταση γύρω από το επίπεδο στο οποίο η εικόνα φαίνεται εστιασμένη και εξαρτάται τόσο από τη μεγέθυνση, όσο και από μεταβολές του NA και μάλιστα κατά τρόπο ανάλογο.⁷

Φωτισμός

Οι τρόποι φωτισμού του αντικειμένου διαφέρουν ανάλογα αν αυτό είναι διαφανές ή αδιαφανές. Ένα διαφανές αντικείμενο φωτίζεται με διερχόμενο φως μέσω του συγκεντρω-

τικού συστήματος. Με προσεκτική ρύθμιση μπορεί να επιτευχθεί ομοιόμορφος φωτισμός (φωτισμός κατά Kϋhler).² Πρόκειται για συγκεκριμένο τρόπο ευθυγράμμισης και ισομερούς κατανομής του φωτεινού μονοπατιού, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου.⁷

Αντίθεση (Contrast) είναι η διαφορά της φωτεινότητας ανάμεσα στις λαμπρότερες και τις σκοτεινότερες περιοχές μιας εικόνας λόγω διαφορών στο χρώμα, στη σκίαση και στην ανακλαστικότητα. Σε φυσιολογικές συνθήκες το μάτι μπορεί να διακρίνει αντίθεση μέχρι 2%.⁵

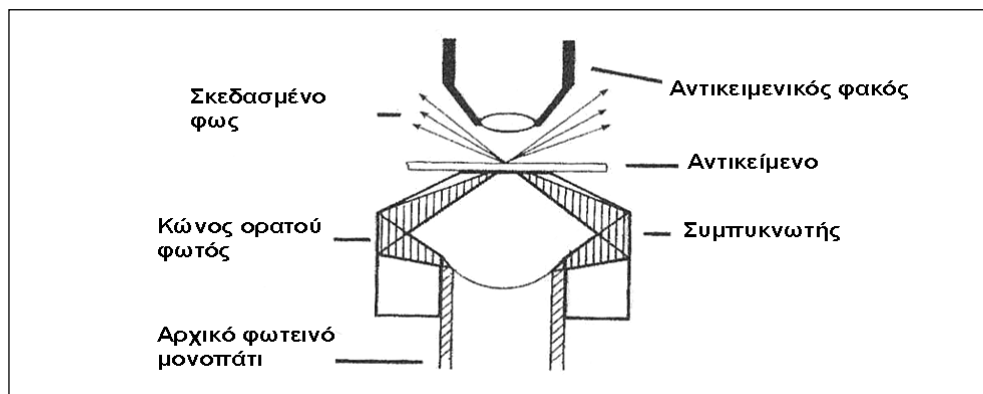
ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου

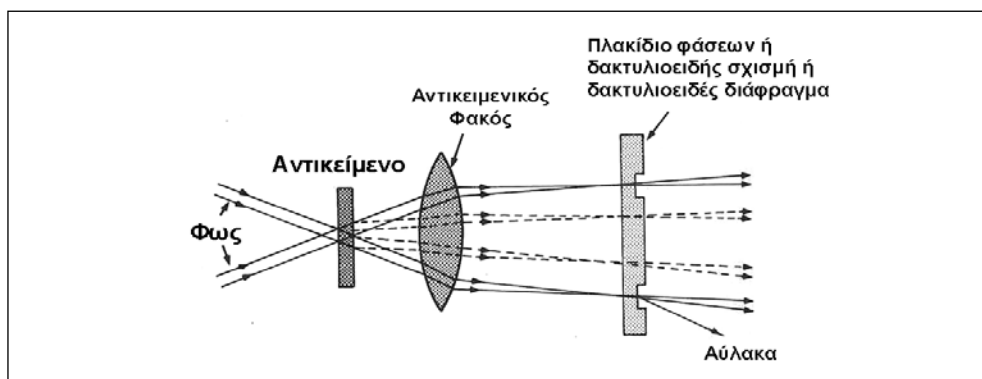
Το μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου, σε αντίθεση με το κοινό μικροσκόπιο, φέρει διάφραγμα και ένα ειδικό συγκεντρωτικό φακό (συμπυκνωτή) με NA μεγαλύτερο του αντικειμενικού φακού, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας κώνος ορατού φωτός του οποίου οι φωτεινές ακτίνες προσπίπτουν υπο γωνία στον αντικειμενικό φακό. Μερικές όμως από τις ακτίνες (σκεδασμένο φως) περνούν από το δείγμα και εστιάζονται στον αντικειμενικό φακό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό φωτεινού ειδώλου σε σκοτεινό πεδίο (Εικόνα 5).^{1,7,8} Το διακριτικό όριο του μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου είναι 0.1 μm ή μικρότερο, σε σχέση με 0,2 μm που είναι του κοινού μικροσκοπίου. Χρησιμοποιείται για την παρατήρηση ζώντων μικροοργανισμών, μικρών και πολύ λεπτών, όπως οι σπειροχαίτες και οι λεπτόσπειρες.

Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων

Το μικροσκόπιο αυτό είναι ένα ειδικό μικροσκόπιο συμβολής. Αντίθετα όμως από το μικροσκόπιο συμβολής, που συμβάλλουν μια διαθλασμένη και μια μη διαθλασμένη δέσμη φωτός, στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων συμβάλλουν ακτίνες που περιθλάστηκαν και δεν περιθλάστηκαν, μετά τη διέλευσή τους μέσα από το ίδιο αντικείμενο (Εικόνα 6). Χρησι-



Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση του τρόπου λειτουργίας του μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου. Το αρχικό φωτεινό μονοπάτι προσπίπτει πάνω στον συμπυκνωτή και δημιουργείται κώνος ορατού φωτός του οποίου οι φωτεινές ακτίνες προσπίπτουν υπο γωνία στον αντικειμενικό φακό. Μερικές όμως από τις ακτίνες (σκεδασμένο φως) περνούν από το δείγμα και εστιάζονται στον αντικειμενικό φακό (από Wiedbrauk D, 2007).



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση τρόπου λειτουργίας μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων (από Προυκάκης Χ, 1983).

μποποιείται για την παρατήρηση λεπτών ($\leq 10 \mu\text{m}$) και χωρίς χρώση ζωντανών παρασκευασμάτων (παρατήρηση βλεφαρίδων, μικροβιακών ενδοσπορίων και κυτταροπλασματικών οργανιδίων ευκαρυωτικών κυττάρων).

Αν το μεγεθυνόμενο αντικείμενο είναι ομοιογενές (π.χ. υγρό διάλυμα), οι φωτεινές ακτίνες, αφού περάσουν από αυτό, ακολουθούν την πορεία συνεχών γραμμών, αντίστοιχα προς το κροσσό μηδενικής τάξης που σχηματίζεται από τις ακτίνες που δεν εκτράπηκαν. Αν όμως το αντικείμενο είναι ανομοιογενές (όπως συμβαίνει με το εναιώρημα που περιέχει κύτταρα), τότε, εκτός από τον κροσσό μηδενικής τάξης, σχηματίζονται και άλλοι από τις ακτίνες που περιθλάστηκαν (διακοπτόμενες γραμμές της Εικόνας 6). Οι ακτίνες των κροσσών αυτών, αφού περάσουν από τον αντικειμενικό φακό, εστιάζονται στο ίδιο εστιακό επίπεδο, αλλά σε διαφορετικές θέσεις. Στο εστιακό αυτό επίπεδο, ως παρεμβολή στο συμπυκνωτή, τοποθετείται ένα *πλακίδιο φάσεων* ή *δακτυλιοειδής σχισμή* ή *δακτυλιοειδές διάφραγμα*, με σχήμα δισκοειδές, που φέρει μια δακτυλιοειδή *αύλακα* στη θέση όπου συγκεντρώνονται οι ακτίνες του κροσσού μηδενικής τάξης και δημιουργεί έναν απατηλό πυρήνα φωτός. Η αύλακα αυτή έχει τόσο βάθος, ώστε οι ακτίνες που διέρχονται να προηγούνται σε οπτικό δρόμο $\lambda/4$ από τις ακτίνες που διέρχονται από άλλες περιοχές του πλακιδίου (λ το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται).¹⁻³

Στην πρώτη εικόνα, που σχηματίζεται σε μεγέθυνση μετά την πρόπτωση του φωτός στο παρασκεύασμα, οι ακτίνες που περιθλάστηκαν έχουν διαφορά φάσης $\lambda/4$ κατά μέσο όρο, σε σχέση με αυτές που δεν περιθλάστηκαν. Μετά τη διόδο του φωτός από το πλακίδιο φάσεων, η διαφορά διπλασιάζεται και γίνεται $\lambda/2$. Επομένως, το σύνολο των ακτίνων οδηγείται σε συμβολή με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ειδώλου που κάθε σημείο του εμφανίζεται φωτεινότερο ή σκοτεινότερο ανάλογα με το δείκτη διάθλασης της παρατηρούμενης περιοχής.^{3,7} Οι αντικειμενικοί φακοί που χρησιμοποιούνται για το συγκεκριμένο μικροσκόπιο είναι με *phase plate*, ώστε να τονίζονται οι διαφορές φάσης σαν διαφορές στην ένταση του φωτός (Ph-1, Ph-2, Ph-3, PhC, PhL, PhP).

Μικροσκόπιο φθορισμού

Το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιεί ως ακτινοβολία υπεριώδεις ακτίνες μήκους κύματος περίπου 3500-4000 E, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η ανίχνευση ενδογενών

βιολογικών ουσιών, που φθορίζουν από μόνες τους (αυτοφθορισμός), και τον εντοπισμό άλλων που έχουν σημειωθεί με φθορίζοντα αντισώματα (ετεροφθορισμός). Γενικά φθορίζουσες ονομάζονται οι ουσίες εκείνες που, όταν απορροφήσουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος.

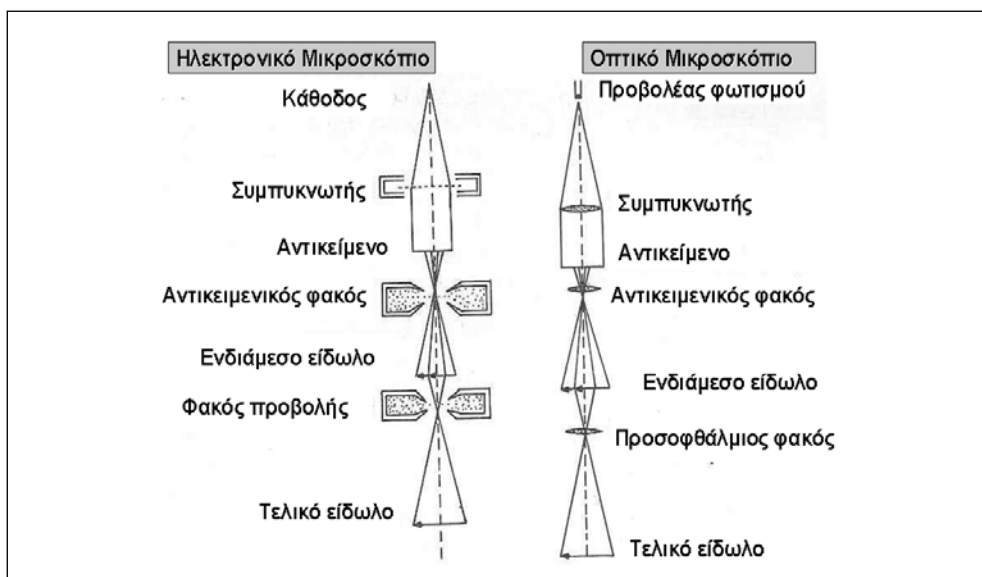
Το μικροσκόπιο φθορισμού ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και αφορούσε μικροσκοπικές μελέτες με τη χρήση χημικών ουσιών που εκπέμπουν φως (φθορίζουν) μετά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως η χλωροφύλλη και η ριβοφλαβίνη, χωρίς να απαιτείται ειδική προηγούμενη επεξεργασία. Κατά τη δεκαετία του 1930 άρχισαν να χρησιμοποιούνται φθοριούχες χρωστικές για την ανίχνευση ουσιών και λοιμογόνων παραγόντων που δεν είχαν την ιδιότητα του αυτοφθορισμού. Οι ουσίες αυτές δεν έχουν ειδικότητα ως προς τον οργανισμό που συνδέονται, αλλά ως προς ειδικούς σχηματισμούς εντός αυτού. Τέτοιες είναι acridine orange (σύνδεση με μόρια DNA και RNA), auramine-rhodamine (σύνδεση με τα μυκολικά οξέα του τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων), calcofluor white (σύνδεση με πολυσακχαρίτες του τοιχώματος μυκήτων), Evans blue (σύνδεση στο κυτταρόπλασμα μονιμοποιημένων κυττάρων) και Hoechst 33258 (σύνδεση με την κύρια θηλιά της πλούσιας σε αδερίνη – θυμίνη διπλής έλικας DNA).^{1,9}

Ο ανοσοφθορισμός, με τη χρησιμοποίηση φθορίζοντων ουσιών συνδεδεμένων με αντισώματα, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Coons και συν. στις αρχές της δεκαετίας του 1940 για την ανίχνευση του πολυσακχαριδικού πνευμονιοκοκκικού αντιγόνου σε ιστούς μολυσμένων ποντικών.¹⁰ Η χρήση των φθορίζοντων αντισωμάτων επεκτάθηκε σημαντικά με την ανακάλυψη της fluorescein isocyanate το 1950 και της περισσότερο σταθερής fluorescein isothiocyanate το 1958 (FITC). Σήμερα το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υβριδισμό των νουκλεϊνικών οξέων στην τεχνολογία FISH (fluorescent in situ hybridization).¹

Απαραίτητα στοιχεία της λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού είναι: α) η έντονη φωτεινή πηγή με σωστή ευθυγράμμιση (αλογόνου-χαλαζία, υδραργύρου υψηλής πίεσης, ξένου), ώστε να μη προκαλείται ελάττωση του σήματος του φθοριοχρώματος, ανομοιογένεια της εικόνας και artefacts, β) η ύπαρξη ουδετέρων φίλτρων και μειωτή, ώστε να περιορίζεται η ένταση και η διάρκεια της ερεθίζουσας ακτινοβολίας στο απαιτούμενο ποσό, γ) τα ειδικά φίλτρα που επιτρέπουν τη δίοδο της συγκεκριμένης ακτινοβολίας, δ) ο διχρωματικός καθρέφτης που επιτρέπει τη δίοδο μεγαλύτερων μηκών κύματος και ε) το φίλτρο φραγής ανεπιθύμητων ακτινοβολιών. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην επιλογή και στο συνδυασμό χρωστικών και φίλτρων.⁷

Μικροσκόπιο πόλωσης ή πολωμένου φωτός ή πολωτικό

Πρόκειται για οπτικό μικροσκόπιο στο οποίο χρησιμοποιούνται δίσκοι διπλοθλαστικού υλικού (π.χ. ασβεστίτη) που λειτουργούν ως πολωτής και ως αναλυτής. Ο πολωτής τοποθετείται πριν το συμπυκνωτή, ώστε το μεγεθυνόμενο αντικείμενο να φωτίζεται με πολωμένο φως, ενώ ο αναλυτής τοποθετείται μεταξύ αντικειμενικού και προσοφθάλμιου φακού. Όταν ο πολωτής και ο αναλυτής διασταυρώνονται, το οπτικό πεδίο του οργάνου εμφανίζεται σκοτεινό, εκτός από τις περιοχές που περιέχουν ουσίες με ιδιότητες στροφής του επιπέδου πόλωσης ή διπλοθλαστικές ουσίες, οι οποίες παρουσιάζονται φωτεινές μέσα σε σκοτεινό υπόστρωμα.^{2,3} Διπλοθλαστικές ιδιότητες έχουν ορισμένα συστατικά των κυττάρων, όπως τα νευρικά ινίδια, ορισμένες ενδοκυττάριας μεμβράνες, κρύσταλλοι και το αμυλοειδές.^{3,7}



Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση που αποσκοπεί να δείξει τις ομοιότητες λειτουργίας του κοινού οπτικού και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (από Προυκάκης Χ, 1983).

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ΗΜ) επιτρέπει τη λήψη μεγεθυμένου ειδώλου ενός αντικειμένου μέσω της αλληλεπίδρασής του με τα ηλεκτρόνια δέσμης που εστιάζεται μέσω «ηλεκτρονικών» φακών. Άρα το μικροσκόπιο αυτό χρησιμοποιεί ως μέσο «φωτισμού» ηλεκτρόνια μεγάλης κινητικής ενέργειας.^{2,3} Το ΗΜ συνεχίζει να έχει σημαντική θέση στη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων, όπου εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα αν και η διαγνωστική του ευαισθησία είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις νεότερες μοριακές μεθόδους. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται σχηματικά οι ομοιότητες που υπάρχουν στην κατασκευή του κοινού οπτικού και του ΗΜ, όταν χρησιμοποιούνται για λήψη μικροφωτογραφιών. Τα κυριότερα από τα ΗΜ που χρησιμοποιούνται στη Μικροβιολογία (ΗΜ) είναι το *ΗΜ εκπομπής* και το *σαρωτικό ΗΜ*.

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εκπομπής

Χρησιμοποιείται για την παρατήρηση δομικών λεπτομερειών των μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των ιών, ακόμη και μορίων νουκλεϊνικών οξέων. Αυτό επιτυγχάνεται γιατί η δέσμη ηλεκτρονίων έχει πολύ μικρό μήκος κύματος ($\sim 0,005 \text{ nm}$), με αποτέλεσμα το διακριτικό όριο να είναι περίπου 100λ, που πρακτικά σημαίνει ότι για υψηλές επιταχύνσεις ηλεκτρονίων είναι μέχρι 2-3 E, περίπου. Η χρήσιμη μεγέθυνση είναι μερικές εκατοντάδες χιλιάδες διάμετροι ($\sim 10^6$ της διαμέτρου).³

Το ΗΜ εργάζεται στο κενό. Η πηγή ηλεκτρονίων είναι νήμα βολφραμίου, που θερμαίνεται και εκπέμπει μια στενή δέσμη ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια αυτά επιταχύνονται με τη χρήση κατάλληλων πεδίων. Η δέσμη φέρεται στο αντικείμενο που μεγεθύνεται, το διαπερνά, και τα ηλεκτρόνια, με την επίδραση πεδίου (που δρα όπως ο αντικειμενικός φακός) εκτρέπονται

γωνιακά από την πορεία τους (αποκλίνουν). Νέα εκτροπή γίνεται με την επίδραση άλλου πεδίου (που λειτουργεί ως προσοφθάλμιος φακός) και τελικά η δέσμη προβάλλεται σε μια φθορίζουσα οθόνη για άμεση επισκόπηση ή σε φωτογραφική πλάκα για φωτογράφιση. Είναι σαφές ότι: α) η μεγέθυνση του αντικειμένου είναι αποτέλεσμα της εκτροπής των ηλεκτρονίων κάτω από την επίδραση κατάλληλων πεδίων και β) οι διάφορες περιοχές της εικόνας που έχει μεγεθυνθεί διακρίνονται ως διαφορετικές γιατί το μεγεθυνόμενο αντικείμενο προκαλεί διαφορετική εξασθένηση της δέσμης ηλεκτρονίων, που διέρχονται μέσα από αυτό, λόγω ανομοιογενούς σύστασής του.³

Σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Το **σαρωτικό ΗΜ ή ΗΜ σάρωσης** παρέχει εικόνες τριών διαστάσεων. Οι εικόνες αυτές δεν είναι εικόνες διατομών, αλλά εικόνες της εξωτερικής επιφάνειας του μεγεθυνόμενου αντικειμένου που μοιάζουν πολύ με τις πραγματικές.³

Τα ηλεκτρόνια παράγονται από θερμαινόμενο νήμα που έχει διαστάσεις λεπτής ακίδας, επιταχύνονται με τη χρήση κατάλληλου πεδίου, δέχονται την επίδραση μαγνητικού φακού και προσπίπτουν στο μεγεθυνόμενο αντικείμενο και προκαλούν την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση της εικόνας. Η δέσμη των ταχέων ηλεκτρονίων, αφού δεχτεί την επίδραση του μαγνητικού φακού, εστιάζει αρχικά σε ένα σημείο του μεγεθυνόμενου αντικειμένου και μετά σαρώνει όλο το αντικείμενο από αριστερά προς τα δεξιά. Όταν φτάσει στο δεξιό άκρο του αντικειμένου, επανέρχεται αριστερά, μια βαθμίδα χαμηλότερα, και συνεχίζει τη σάρωση σε σειρές. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια διαμορφώνουν την ένταση μιας άλλης δέσμης ηλεκτρονίων, που σαρώνει την οθόνη του σωλήνα καθοδικών ακτίνων του ΗΜ και παρουσιάζει μια εικόνα όπως οι συσκευές τηλεόρασης. Οι διαφορές στην εικόνα είναι αποτέλεσμα των διαφορών της εξωτερικής επιφάνειας του μεγεθυνόμενου αντικειμένου, που προκαλούν διαφορετική εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων.³

Το μικροσκόπιο συνεχίζει να έχει κεντρική θέση στην ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων μολυσματικών παραγόντων, παρά την εφαρμογή νεότερων τεχνικών μοριακής μικροβιολογίας. Βελτιώσεις, εξάλλου, στο σχεδιασμό, την ανάλυση και την εργονομία των σύγχρονων μικροσκοπίων έχουν ως αποτέλεσμα να προσφέρουν ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα στη μελέτη των διαφόρων μικροοργανισμών. Η μικροσκοπική εξέταση των κλινικών δειγμάτων αποτελεί τον πρώτο, γρήγορο και οικονομικό τρόπο προσέγγισής τους και, επομένως, η μικροσκόπηση ήταν, είναι και θα είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της καθημερινής ρουτίνας του μικροβιολογικού εργαστηρίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wiedbrauk D. Microscopy. In: Murray P. (Editor-in-chief). Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 173-181.
2. Chapin K. Clinical Microscopy. In: Manual of Clinical Microbiology, 6th ed, Murray P et al. Eds. Washington D.C: American Microbiology Society Press; 1995. p. 33-51.
3. Προυκάκης Χ. Οπτική. Από: Ιατρική Φυσική, τόμος 2^{ος}, Αθήνα: 1983, σελ. 195-205.
4. Abramowitz M. Microscope: Basics and beyond, vol. 1, Melville, NY: Olympus America; 2003.

5. Abramowitz M.. Optics: A Primer. Melville, New York: Olympus Corporation Publishing; 1994.
6. Douglas S. Microscopy. In: Manual of Clinical Microbiology. Lennette E et al. eds, 4th ed, 1985, ASM Press; p. 8-13.
7. Ζαχαριάδου Λ. Μικροσκόπια – Αρχές λειτουργίας, εφαρμογές. Ενιαίο Πρόγραμμα μαθημάτων ειδικευομένων στη Μικροβιολογία. Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία (www.hms.org.gr 20/2/2008)
8. Καποτάς Ν. Πρακτική άσκηση στην Ιατρική Μικροβιολογία και στοιχεία Κλινικής Μικροβιολογίας, 2^η έκδοση, Αθήνα: 2006.
9. Abramowitz M. Fluorescence Microscopy: The essentials, vol 4, Melville, NY: Olympus America; 1993.
10. Coons A, Creech H, Jones R. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc Soc Exp Biol Med 1941; 47: 200-202.

Μέθοδοι αναζήτησης λοιμωδών παραγόντων

Α. Χαρισιάδου, Α. Πάγκαλη

Οι λοιμώδεις παράγοντες οι οποίοι προκαλούν νοσήματα γενικότερα, και νοσήματα του ανώτερου και του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, ειδικότερα, κατατάσσονται στα βακτήρια, τους μύκητες και τους ιούς. Το Εργαστήριο διαθέτει πληθώρα μεθόδων, συμβατικών και σύγχρονων, για τη διάγνυσή τους, οι δε κύριοι στόχοι της διαγνωστικής αποσκοπούν:

- 1) Στην *απομόνωση του παθογόνου αιτίου* με καλλιέργεια (βακτήρια, μύκητες, ιοί) και στη συνέχεια τον έλεγχο της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά αν πρόκειται για βακτήρια ή μύκητες.
- 2) Στην *άμεση ανίχνευση αντιγονικών στοιχείων* του υπεύθυνου μικροοργανισμού με γρήγορες ανοσολογικές μεθόδους (π.χ. αντιγόνο στρεπτοκόκκου ομάδας Α στο φαρυγγικό επίχρισμα, αντιγόνο ιού γρίπης, RSV και άλλων αναπνευστικών ιών στο ρινικό έκπλυμα, αντιγόνα πνευμονιοκόκκου και λεγιονέλας στα ούρα).
- 3) Στην *αναζήτηση αντισωμάτων* IgG και IgM στον ορό του ασθενούς.

Προϋπόθεση για την επιτυχία της διάγνωσης είναι η λήψη του κατάλληλου αναπνευστικού δείγματος και δείγματος αίματος, η συλλογή τους στο σωστό υλικό μεταφοράς, η γρήγορη αποστολή τους στο Εργαστήριο και η επεξεργασία τους από το Εργαστήριο εντός αποδεκτών χρονικών ορίων.

Τα δείγματα συνοδεύονται πάντα από παραπεμπτικό στο οποίο αναγράφονται στοιχεία που αφορούν στην ταυτότητα του ασθενούς (ονοματεπώνυμο και ηλικία), την κλινική εικόνα, την προηγηθείσα λήψη αντιβιοτικών, το χρόνο έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου, την υποκείμενη νόσο ή ανοσοκαταστολή.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Ανώτερο αναπνευστικό

Σε περιπτώσεις φαρυγγοαμυγδαλίτιδας ή οξείας και χρόνιας παραρρινοκολπίτιδας, χρησιμοποιούνται διάφορα *επίχρισματα* όπως ρινοφαρυγγικό, οπισθοφαρυγγικό, αμυγδαλικό καθώς και υλικό *παρακεντήσεως* των παραρρινικών κοιλοτήτων ή υλικό βιοψίας, ακόμη δε και *ρινοφαρυγγικό έκπλυμα* για αναζήτηση αναπνευστικών ιών.

Κατώτερο αναπνευστικό

Σε περιπτώσεις πνευμονίας – βρογχοπνευμονίας, εμπυήματος, πλευριτικής συλλογής χρησιμοποιούνται *πτύελα* αυτόματης ή προκλητής απόχρεμψης, τα οποία λαμβάνονται αφού προηγηθεί επιμελές πλύσιμο του στόματος του ασθενούς με αποστειρωμένο νερό

ή φυσιολογικό ορό, για να απομακρυνθεί η φυσιολογική χλωρίδα του στόματος, καθώς επίσης και *τραχειοβρογχικές εκκρίσεις* (TBA), που λαμβάνονται με αναρρόφηση δια μέσου καθετήρα. Τα δείγματα αυτά θεωρούνται μη επεμβατικά.

Με επεμβατικές τεχνικές (επεμβατικά δείγματα) λαμβάνονται το *βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα* (bronchoalveolar lavage, BAL) και *δείγματα προστατευμένης βρογχικής βούρτσας* (Protected Bronchial Brush, PBB). Τα βρογχικά και βρογχοκυψελιδικά δείγματα λαμβάνονται μέσω βρογχοσκοπίου. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν δείγματα που λαμβάνονται με *διατραχειακή αναρρόφηση*, ενώ σπανίως χρησιμοποιούνται και δείγματα πνευμονικού ιστού που λαμβάνονται με *διαθωρακική αναρρόφηση* με λεπτή βελόνη ή με ανοικτή ή θωρακοσκοπική *βιοψία πνεύμονα*.

Πλευριτικό υγρό λαμβάνεται με παρακέντηση της υπεζωκτικής κοιλότητας.

ΜΕΣΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την παραλαβή των επιχρισμάτων χρησιμοποιούνται *στυλεοί* οι οποίοι φέρουν είτε σταθερό ξύλινο ή πλαστικό στέλεχος, είτε εύκαμπτο συρμάτινο και βύσμα από βαμβάκι, ντάκρον ή αλγινικό ασβέστιο. Πρόσφατα έκαναν την εμφάνισή τους και στυλεοί με άκρο από ειδικό συνθετικό υλικό και μορφή μαλακής βούρτσας για παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος.

Οι στυλεοί τοποθετούνται σε κατάλληλα υλικά μεταφοράς που συντηρούν τη βιωσιμότητα αερόβιων, αναερόβιων και μικροαερόφιλων παθογόνων για 24-48 ώρες, χωρίς να υποστηρίζουν την ανάπτυξή τους. Τα υλικά μεταφοράς διαφοροποιούνται ανάλογα με τα παθογόνα που αναζητούνται. Για το λόγο αυτό, όταν αναζητούνται ειδικά παθογόνα θα πρέπει να γίνεται προηγουμένως επικοινωνία και συνεννόηση με το Εργαστήριο. Τα κυριότερα υλικά μεταφοράς είναι τα Stuart, Amies με ή χωρίς ενεργό άνθρακα, διάλυμα 1% *casamino acid*, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS).

Τα υλικά *παρακεντήσεως* συλλέγονται και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια ή ευρύστομα δοχεία με βιδωτό πώμα.

Τα *πτύελα* συλλέγονται επίσης σε ευρύστομα στεγανά δοχεία τα οποία δυνατόν να φέρουν και χωνοειδές προσάρτημα για τη διευκόλυνση του ασθενούς κατά την απόχρεμψη. Τα τρυβλία δεν είναι αποδεκτά μέσα συλλογής πτυέλων.

Το *βρογχικό* και *βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα* συλλέγονται στο δοχείο παγίδα (trap) που προσαρμόζεται στο βρογχοσκόπιο.

Τέλος, το *δείγμα προστατευμένης βρογχικής βούρτσας* (PBB) είναι η ίδια η βούρτσα η οποία αποκόπτεται μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάριο το οποίο περιέχει 1 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού ή διαλύματος Ringer's lactate.

Τα *δείγματα βιοψίας* και *αναρρόφησης* μεταφέρονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια ή δοχεία ή ακόμη στη σύριγγα της παρακέντησης.

Όλα τα δείγματα, κυρίως τα επεμβατικά, είναι πολύτιμα και πρέπει να λαμβάνονται και να διακινούνται με μεγάλη προσοχή και ασφάλεια στο Εργαστήριο.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΥΡΩΝ

Τα δείγματα αίματος προορίζονται για αιμοκαλλιέργεια και/ή αναζήτηση αντισωμάτων διαφόρων παθογόνων και τα δείγματα ούρων για αναζήτηση αντιγόνων πνευμονιοκόκου και λεγιονέλλας.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ανώτερο αναπνευστικό

Τα παθογόνα που αναζητούνται στις αναπνευστικές λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού είναι: *Streptococcus*, *β-hemolytic group A*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella* spp. και άλλα εντεροβακτηριακά, *Bacteroides* spp. και άλλα αναερόβια.

Για την καλλιέργεια χρησιμοποιούνται κοινά θρεπτικά υλικά, όπως αιματούχο και σοκολατόχρωμο άγαρ, τα οποία επωάζονται αερόβια, αναερόβια ή σε συνθήκες διοξειδίου του άνθρακα 5% και σε θερμοκρασία 35°C. Ειδικά θρεπτικά υλικά απαιτούνται για τα *C. diphtheriae*, *N. meningitidis*, *B. pertussis* και τα αναερόβια. Η εκλογή τους βασίζεται στην κλινική εικόνα και γίνεται μετά από συνεννόηση με τους κλινικούς. Μετά την απομόνωση του παθογόνου ακολουθεί κατά περίπτωση ορολογική τυποποίηση (π.χ. *Streptococcus group A*, *H. influenzae group B*, *N. meningitidis group A, B, C*) και αντιβιογράμμα.

Κατώτερο αναπνευστικό

Στις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού θα αναζητηθούν *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* κ.ά. εντεροβακτηριακά, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella* spp, *Mycobacterium* spp, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica* και άλλα αναερόβια, *Bordetella* spp, καθώς και *Pseudomonas* spp, και *Aspergillus* spp σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και ασθενείς με κυστική ίνωση.

Τα δείγματα του κατώτερου αναπνευστικού ελέγχονται ως προς την καταλληλότητά τους πριν από την καλλιέργεια. Κατάλληλα θεωρούνται όλα τα επεμβατικά δείγματα (TBA, BAL, PBB). Τα μη επεμβατικά (πτύελα) θεωρούνται κατάλληλα όταν η σχέση λευκοκύτταρα/πλκώδη επιθήλια είναι μεγαλύτερη του 2:1, ή όταν τα πλκώδη επιθηλιακά κύτταρα είναι <10 κ.ο.π. και τα λευκοκύτταρα ≥25 κ.ο.π. Ακατάλληλα δείγματα θεωρούνται ο σίελος, τα επιχρίσματα και 24ωρη συλλογή πτυέλων.

Η καταλληλότητα ελέγχεται μικροσκοπικά με χρώση Gram του παρασκευάσματος. Δεν ελέγχεται όταν αναζητούνται μυκοβακτηρίδια, μυκόπλασμα, *Legionella* spp, μύκητες. Τα ακατάλληλα δείγματα δεν καλλιεργούνται και απορρίπτονται, μετά από ενημέρωση των κλινικών ιατρών, όμως δεν απορρίπτονται δείγματα από ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

Το άμεσο παρασκεύασμα των δειγμάτων είναι μια γρήγορη χρήσιμη εξέταση που γίνεται παράλληλα με τον εμβολιασμό των δειγμάτων στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Έχει χαμηλή ευαισθησία, 10%, όταν όμως είναι θετική έχει ειδικότητα 70-80% και μας ανακαλύπτει πτυοφαίρια, ως στοιχείο φλεγμονής, κόκκους και βακτηρίδια ενδο- και εξωκυττάρια με παθογνωμονική διάταξη, καθώς και στοιχεία μυκήτων (υφές και βλαστικά κύτταρα).

Εκτός από τα κοινά θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται και ειδικά υλικά κατά περίπτωση, όπως Agar Sabouraud για μύκητες ή ειδικό υλικό για *B. cepacia* στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

Τα μη επεμβατικά δείγματα (πτύελα και τρχειοβρογχικές εκκρίσεις) καλλιεργούνται ημιποσοτικά, ενώ τα επεμβατικά (BAL και PBB), που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του αιτιολογικού παράγοντα της πνευμονίας που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα σε διασωληνωμένους ασθενείς της ΜΕΘ (Ventilator Associated Pneumonia, VAP) καλλιεργούνται ποσοτικά για το διαχωρισμό της λοίμωξης από τον αποικισμό του αναπνευστικού συστήματος.

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Η αναζήτηση των αντιγόνων αποσκοπεί στη γρήγορη διάγνωση των παθογόνων και εφαρμόζεται στις λοιμώξεις τόσο του ανώτερου όσο και του κατώτερου αναπνευστικού.

Χρησιμοποιούνται αναπνευστικά δείγματα, αίμα και ούρα, και εφαρμόζονται οι τεχνικές του άμεσου ανοσοφθορισμού (κοκύτης, RSV, αδενοϊοί, ιοί γρίπης κ.ά.) και ανοσοενζυματικές με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα υπό τη μορφή συγκόλλησης σωματιδίων Latex και κυρίως ανοσοχρωματογραφίας πλάκας ή ταινίας (*Streptococcus* ομάδας A, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, RSV, ιοί *Influenzae* και *Parainfluenzae*, αδενοϊοί, *Legionella*, κ.ά.).

Αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται και μοριακές τεχνικές όπως PCR, RT-PCR, in situ υβριδισμός, με προοπτικές ευρύτερης εφαρμογής.

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα αντισώματα αναζητούνται παράλληλα με την αναζήτηση των λοιμωδών παραγόντων και είτε επιβεβαιώνουν το θετικό αποτέλεσμα καλλιέργειας / αντιγόνου, είτε είναι το μοναδικό στοιχείο για τη διάγνωση. Χρησιμοποιούνται τεχνικές σύνδεσης συμπληρώματος (CF), έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA), ανοσοενζυματικές (ELISA) και νεφελομετρικές, προσδιορίζοντας ολικά και ειδικά αντισώματα τύπου IgG και IgM.

Παρά την πληθώρα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την αιτιολογική διάγνωση των λοιμώξεων του αναπνευστικού, σε μεγάλο ποσοστό ο αιτιολογικός παράγοντας παραμένει αδιάγνωστος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Waites KB, Saubolle MA, Talkington DF, Moser SA, Baleski V. Cumitech 10A, Laboratory diagnosis of upper respiratory tract infections. Coordinating ed, Sharp SE. Washington DC: ASM Press; 2002.
2. Sharp SE, Robinson A, Saubolle MA, Santa Cruz M, Carroll K, et al. Cumitech 7B, Lower Respiratory Tract Infections. Coordinating ed, Sharp SE. Washington DC: ASM; 2004.
3. Αρσένη Α. Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων. 4η έκδοση, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις ΖΗΤΑ; 1994.
4. Κουππάρη Γ. Εργαστηριακή διερεύνηση λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Εφαρμ Κλιν Μικροβ Εργ Διαγν 2002; 7: 13-18.
5. Θέμελη-Διγαλάκη Κ. Εργαστηριακή διάγνωση πνευμονίας. Ορολογικές – Μοριακές μέθοδοι. Εφαρμ Κλιν Μικροβ Εργ Διαγν 2002; 7: 19-26.
6. Μαλάμου-Λαδά Ε. Εργαστηριακή διάγνωση πνευμονίας. Καλλιεργητικές μέθοδοι και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Εφαρμ Κλιν Μικροβ Εργ Διαγν 2002; 7: 165-173.
7. Koneman EW, Allen SO, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, editors? Diagnostic Microbiology. 5th ed, Philadelphia, New York: Lippincot; 1977.
8. Isenberg HD. (ed), Essential procedures for Clinical Microbiology, Washington DC: ASM press; 1998.

Μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης ιογενών παραγόντων

Α. Μίχος

Οι ιοί έχουν την ικανότητα να προκαλούν λοιμώξεις σε διαφορετικά σημεία του αναπνευστικού συστήματος με ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων. Τα κλινικά σημεία και συμπτώματα συχνά δεν είναι ειδικά για να διαχωρίσουν την ιογενή από τη μικροβιακή λοίμωξη, ούτε λοίμωξη από διαφορετικούς ιούς μεταξύ τους. Οξεία αναπνευστική νόσος που προκαλείται από ιογενή λοίμωξη είναι η πιο συχνή αιτία νοσηλείας σε παιδιά στις ΗΠΑ.¹ Ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV), ο ιός της γρίπης Α και Β, ο αδενοϊός, ο ιός της παραγρίπης, ο μεταπνευμονοϊός είναι μεταξύ των ιών που μπορούν να προκαλέσουν κλινικά σύνδρομα που χρειάζονται νοσηλεία. Από μελέτες έχει βρεθεί ότι οι παιδίατροι χορηγούν αντιβιοτικά σε 20% των παιδιών με λοίμωξη του ανωτέρου αναπνευστικού, σε 40% των παιδιών με βρογχιολίτιδα και περίπου σε 100% των περιπτώσεων πνευμονίας παρότι σημαντικό ποσοστό των λοιμώξεων αυτών οφείλεται σε ιούς.¹⁻³

Η ταχεία διάγνωση ιογενών λοιμώξεων είναι πολύ σημαντική στην κλινική πράξη και μπορεί να βοηθήσει στη

- μείωση της άσκοπης χρήσης αντιβιοτικών που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ποσοστού αντοχής των μικροβίων,
- αποφυγή νοσηλείας ή τη μείωση της διάρκειας της νοσηλείας,
- χορήγηση ειδικής θεραπείας έναντι ιών όπου υπάρχει δυνατότητα, ιδιαίτερα για ειδικές ομάδες ασθενών, όπως νεογνά και ανοσοκατεσταλμένοι,
- αιτιολογική διερεύνηση επιδημιών και τη λήψη μέτρων απομόνωσης ασθενών,
- μείωση κόστους λόγω χρήσης υπηρεσιών υγείας, προσωπικού, πολύπλοκων διαγνωστικών εξετάσεων.⁴

Οι μέθοδοι διάγνωσης των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 1) και είναι σκόπιμο ο κλινικός ιατρός να είναι εξοικειωμένος με τις δυνατότητες αλλά και τους περιορισμούς της κάθε μεθόδου.⁵

Θα αναφερθούμε αναλυτικότερα σε ταχείες μεθόδους διάγνωσης για τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό, τον ιό της γρίπης Α και Β, τους ιούς της παραγρίπης, τους ρινοϊούς, τους αδενοϊούς και τον ανθρώπινο μεταπνευμονοϊό.

ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΣ ΣΥΓΚΥΤΙΑΚΟΣ ΙΟΣ

Ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV) αποτελεί το κυριότερο αίτιο λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος σε βρέφη μικρότερα του ενός έτους. Περισσότερα από 90%

Πίνακας 1. Σύγκριση μεθόδων διάγνωσης ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού (τροποποιημένο από Myint et al).⁵

Χαρακτηριστικά μεθόδου	Καλλιέργεια	Ανοσοφθορισμός (IFA,DFA)	Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)	Χρήση ιχνηθετών (probes) χωρίς ενίσχυση στόχου	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
Ταχύτητα	+	+++	+++	++	++/+++
Ευαισθησία	+++	++	++	++	++++
Ειδικότητα	+++	++	++	+++	++++
Ποσοτική μέτρηση	++	++	++	+	+++
Ευκολία χρήσης	+	+	+++	+	++/+++
Κόστος	++	+	+	++	+++

των παιδιών έχουν ορολογική ένδειξη λοίμωξης κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων ετών ζωής.⁶ Στις ΗΠΑ έχει βρεθεί ότι αποτελεί το πρώτο αίτιο νοσηλείας για νεογνά με αποτέλεσμα περισσότερες από 125.000 νοσηλείες το χρόνο. Ετήσιες επιδημίες συμβαίνουν σε χώρες με εύκρατο κλίμα μεταξύ του τέλους του φθινοπώρου και της άνοιξης.⁷ Τα κλινικά σημεία και συμπτώματα δεν βοηθούν στη διάκριση της RSV λοίμωξης από άλλες ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού. Λοίμωξη από RSV δεν αφήνει ανοσία και επαναλοίμωξη είναι συχνή σε όλη τη διάρκεια της ζωής.⁸

Οι υπάρχουσες μέθοδοι διάγνωσης περιλαμβάνουν απομόνωση του ιού σε κυτταρική καλλιέργεια, ανίχνευση αντισωμάτων, και άμεση εξέταση αναπνευστικών εκκρινμάτων για αντιγόνα του ιού. Η καλλιέργεια του ιού ήταν για αρκετά χρόνια η διαγνωστική μέθοδος αναφοράς, αλλά απαιτεί εξειδικευμένο εργαστήριο και είναι χρονοβόρα (2-5 μέρες). Η ανίχνευση αντισωμάτων δεν είναι χρήσιμη για τη διάγνωση της οξείας RSV λοίμωξης, καθώς 10-30% των ασθενών με τεκμηριωμένη λοίμωξη θα παραμείνουν οροαρνητικοί.⁹

Ανίχνευση αντιγόνων του ιού

Οι ταχείες μέθοδοι διάγνωσης λοίμωξης από RSV ανιχνεύουν την παρουσία του αντιγόνων του ιού σε εκκρίματα από το αναπνευστικό. Άμεση ανίχνευση του ιού μπορεί να γίνει με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, άμεσο (DFA) και έμμεσο (IFA) ανοσοφθορισμό, ανοσοενζυμικές μεθόδους (EIA), οπτική ανοσοενζυμική μέθοδο (OIA) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται ευρύτατα γιατί είναι εύκολες στη εφαρμογή και την ερμηνεία τους και έχουν ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα την περίοδο έξαρσης νόσησης από RSV (Πίνακας 2). Αντίθετα, σε πληθυσμούς ανοσοκατεσταλμένων, ηλικιωμένων καθώς και σε χρονικές περιόδους που η επίπτωση της νόσησης από RSV είναι χαμηλή, τα αποτελέσματά τους έχουν μέτρια ευαισθησία και ειδικότητα. Η Αμερικάνικη Ακαδημία Παιδιατρικής δεν συνιστά να χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου ως ρουτίνα για τη διάγνωση της RSV λοίμωξης, καθώς το αποτέλεσμα τους τελικά δεν επηρεάζει την αντιμετώπιση του ασθενούς που έχει κλινικά διαγνωσθεί με βρογχολίτιδα.¹⁰ Στο εμπόριο κυκλοφορούν και μέθοδοι που ανιχνεύουν συγχρόνως αντιγόνα διαφορετικών ιών συμπεριλαμβανομένου και RSV.¹¹

Πίνακας 2. Μέθοδοι ταχείας διάγνωσης για RSV με ανίχνευση αντιγόνου σε σύγκριση με την κυτταρική καλλιέργεια (τροποποιημένο από Henrickson et al).⁹

Μέθοδος	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
IFA/DFA	93-98	92-97
EIA	59-97	75-100
DIA	93	91
OIA	88-95	97-100

IFA/DFA: έμμεσος και άμεσος ανοσοφθορισμός, EIA: ανοσοενζυμική μέθοδος, DIA: άμεση ανοσοενζυμική μέθοδος, OIA: οπτική ανοσοενζυμική μέθοδος

Μοριακές μέθοδοι

Οι μοριακές μέθοδοι τείνουν να αντικαταστήσουν την κυτταρική καλλιέργεια ως διαγνωστική μέθοδο αναφοράς για τη διάγνωση λοίμωξης από RSV. Οι μέθοδοι αυτές που χρησιμοποιούν real time-PCR έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (περίπου 100%) όταν συγκρίνονται με κυτταρική καλλιέργεια ή μεθόδους ανίχνευσης αντιγόνων του ιού.⁹ Μειονεκτήματα είναι ότι απαιτούν εξειδικευμένα εργαστήρια με ακριβό τεχνολογικό εξοπλισμό, έχουν αυξημένο κόστος και χρειάζονται 3-8 ώρες για να δώσουν αποτελέσματα. Έχουν δοκιμαστεί μοριακές μέθοδοι που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση 7-26 διαφορετικών ιών ταυτόχρονα (multiplex real time-PCR) μαζί με RSV, αλλά βρίσκονται ακόμη σε ερευνητικό επίπεδο.¹¹

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α ΚΑΙ Β

Η νόσηση από τον ιό της γρίπης σχετίζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Τα παιδιά συγκρινόμενα με τους ενήλικους παρουσιάζουν μεγαλύτερη επίπτωση νόσησης και έχουν παρατεταμένη απέκκριση του ιού με αποτέλεσμα μεγαλύτερη μετάδοση στην κοινότητα.¹² Η χρήση ταχέων μεθόδων διάγνωσης θα πρέπει να γίνεται όταν το αποτέλεσμα πρόκειται να επηρεάσει κλινικές αποφάσεις σχετικά με την αντιμετώπιση των ασθενών. Μπορούν να χρησιμοποιούνται επίσης για επιδημιολογική επιτήρηση, διερεύνηση επιδημιών στην κοινότητα, σε ταξιδιώτες που επιστρέφουν από χώρες υψηλού κινδύνου.

Ανίχνευση αντιγόνων του ιού

Οι μέθοδοι αυτές είναι ανοσοενζυμικές που ανιχνεύουν αντιγόνα του ιού της γρίπης και δίνουν αποτελέσματα μέσα σε 30 min. Περισσότερες από 10 μέθοδοι έχουν εγκριθεί από το FDA (Food and Drug Administration).¹³ Οι ταχείες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται διαφέρουν μεταξύ τους σε κάποια χαρακτηριστικά, καθώς ορισμένες μπορούν να διαγνώσουν γρίπη Α και Β και να τις διαχωρίσουν, ενώ άλλες δεν μπορούν να κάνουν διαχωρισμό ή διαγιγνώσκουν μόνον γρίπη Α ή Β. Οι περισσότερες από τις μεθόδους μπορούν να χρησιμοποιήσουν ποικιλία δειγμάτων, αλλά η ευαισθησία και η ειδικότητά τους διαφέρει ανάλογα με το είδος του δείγματος (π.χ. ρινικό ή φαρυγγικό επίχρισμα). Ο κλινικός γιατρός θα πρέπει να γνωρίζει αν οι μέθοδοι είναι εγκεκριμένες για συγκεκριμένο είδος δειγμάτων και εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε στυλεός για τη συλλογή του δείγματος ή μόνον αυτός που παρέχεται από τον κατασκευαστή.

Η διάμεση ευαισθησία αυτών των μεθόδων είναι περίπου 70-75% και η διάμεση ειδι-

κότητα είναι 90-95%.¹³ Σε μελέτες που περιελάμβαναν μόνο παιδιά, οι ταχείες μέθοδοι για τη διάγνωση της γρίππης έχουν βρεθεί να έχουν ευαισθησία 63% και ειδικότητα 97%.¹⁴ Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν με τις ταχείες μεθόδους θα πρέπει να συλλέγονται όσο το δυνατόν συντομότερα από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων και όχι αργότερα από 4-5 ημέρες στους ενήλικες. Στα μικρά παιδιά, ο ιός της γρίππης μπορεί να διασπείρεται για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, οπότε έλεγχος και μετά τις 5 ημέρες μπορεί να είναι χρήσιμος.^{12, 14}

Η θετική και αρνητική προγνωστική αξία των μεθόδων εξαρτάται από την επίπτωση της γρίππης στην κοινότητα (Πίνακας 3).¹⁵ Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβούν σε χρονικές περιόδους που η επίπτωση της γρίππης είναι χαμηλή, όπως στην αρχή και το τέλος της περιόδου έξαρσης της γρίππης. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβούν όταν η επίπτωση της γρίππης είναι υψηλή.¹³

Η επιλογή των μεθόδων θα πρέπει να γίνεται με βάση το είδος των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν και σε περίπτωση σοβαρών κλινικών αποφάσεων το αποτέλεσμα θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με real time- PCR, IFA ή κυτταρική καλλιέργεια.

Μοριακές μέθοδοι

Υπάρχουν μέθοδοι real time-PCR που ανιχνεύουν τον ιό της γρίππης και θεωρούνται πιο ευαίσθητες και από την καλλιέργεια του ιού. Μπορούν να βελτιώσουν τη δυνατότητα ανίχνευσης του ιού σε σχέση με την καλλιέργεια από 2-13%, αλλά δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ ζωντανού και νεκρού ιού.¹²

ΙΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΡΙΠΗΣ

Οι ιοί της παραγρίππης αποτελούν το δεύτερο αίτιο νοσηλείας μετά τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό σε μικρά παιδιά με λοίμωξη αναπνευστικού. Συνήθως οι ιοί παραγρίππης 1 και 2 σχετίζονται με λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα, ενώ ο τύπος 3 κυρίως με πνευμονία και βρογχιολίτιδα.

Τα διαγνωστικά δείγματα από το ρινοφάρυγγα θα πρέπει να μεταφέρονται στο εργαστήριο σε θερμοκρασία 4 °C. Οι ταχείες διαγνωστικές μέθοδοι με ανίχνευση αντιγόνων του ιού παραγρίππης, όπως ο άμεσος ανοσοφθορισμός (DFA), έχουν ευαισθησία 60%-88%.^{16, 17}

Η ανάπτυξη μεθόδων multiplex real-time PCR για την ανίχνευση ταυτόχρονα πολλών ιών συμπεριλαμβανομένων αυτών της παραγρίππης έχουν δώσει καλά αποτελέσματα.^{18, 19}

Πίνακας 3. Πιθανότητα διάγνωσης γρίππης χρησιμοποιώντας ταχείες μεθόδους, σε διαφορετικές περιόδους επίπτωσης γρίππης και με θεωρητική ευαισθησία μεθόδου 73% και ειδικότητα 96% (τροποποιημένο από Ebell et al).¹⁵

Επίπτωση γρίππης	(PCR) Πιθανότητα γρίππης (%)		
	Πριν από τη μέθοδο	Αρνητικό αποτέλεσμα	Θετικό αποτέλεσμα
Χαμηλή	2	<1	27
Μέτρια	5-10	1-3	49-67
Υψηλή	30-50	11-22	89-95

ΑΔΕΝΟΪΟΣ

Ο αδενοϊός μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, όπως πνευμονία, βρογχιολίτιδα και επιπεφυκίτιδα. Λοίμωξη από αδενοϊό μετά από μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή μυελού των οστών μπορεί να προκαλέσει σοβαρή μυελοκαταστολή.^{17,20}

Η έγκαιρη λήψη κλινικού δείγματος είναι σημαντική για την εργαστηριακή διάγνωση του ιού. Η διάρκεια απομόνωσης του ιού είναι περίπου 3-5 μέρες σε λήψη από το ρινοφάρυγγα σε ενήλικους, 3-6 εβδομάδες από το φάρυγγα ή τα κόπρανα σε παιδιά με λοίμωξη αναπνευστικού, 2 εβδομάδες σε επιπεφυκίτιδα, και 2 έως 12 μήνες από ούρα και κόπρανα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.²¹

Η χρήση ταχέων μεθόδων ανίχνευσης αντιγόνου με ανοσοφθορισμό έχει ευαισθησία 62%, ενώ σε ασθενείς με σοβαρή συμπτωματολογία φθάνει το 88%.¹⁷

Η χρήση PCR που ανιχνεύει κοινή περιοχή των αδενοϊών εμφανίζεται να παρουσιάζει ευαισθησία έως 90% σε σύγκριση με την καλλιέργεια.²¹ Σε άλλες μελέτες όμως έχει ανευρεθεί θετική σε 50% των παιδιών με μέση ηλικία 21 μηνών, και σε 18% των ενηλίκων χωρίς κλινική συμπτωματολογία, πιθανώς λόγω παρουσίας του ιού σε λανθάνουσα κατάσταση.^{22, 23}

ΡΙΝΟΪΟΙ

Οι ρινοϊοί αποτελούν το κύριο αίτιο του κοινού κρυολογήματος. Προκαλούν συνήθως ήπια νόσο, αλλά με μεγάλη νοσηρότητα που συνεπάγεται σημαντικό οικονομικό κόστος ενώ εμπλέκονται και στην έξαρση ασθματικών κρίσεων.

Η ύπαρξη πολλών τύπων ρινοϊών και οι ομοιότητες που παρουσιάζουν με τους εντεροϊούς δυσκολεύει την ανάπτυξη μεθόδων ταχείας διάγνωσης. Η ανάπτυξη μοριακών μεθόδων βοήθησε στη απομόνωση ρινοϊών τόσο από δείγματα του αναπνευστικού όσο και από το αίμα.²⁴

ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΜΕΤΑΠΝΕΥΜΟΝΟΪΟΣ

Ο ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός ανακαλύφθηκε το 2001 και φαίνεται ότι προκαλεί σημαντικό ποσοστό λοιμώξεων αναπνευστικού στα παιδιά.²⁵

Η διάγνωση με κυτταρική καλλιέργεια δεν είναι εύκολη καθώς απαιτεί ειδικές κυτταρικές σειρές. Ταχείες μέθοδοι διάγνωσης λοίμωξης από τον ανθρώπινο μεταπνευμονοϊό δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνυσή του σε ερευνητικά εργαστήρια βασίζονται σε PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) ή real-time PCR.²⁶

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ύπαρξη αξιόπιστων ταχέων μεθόδων διάγνωσης ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού μπορεί να συμβάλει στη μείωση της άσκοπης χρήσης αντιμικροβιακής θεραπείας που οδηγεί σε ανάπτυξη αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Η σωστή λήψη και μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο και η συνεργασία των κλινικών με τους εργαστηριακούς ιατρούς είναι απαραίτητα ώστε η εφαρμογή των ταχέων μεθόδων διάγνωσης ιογενών λοιμώξεων να αποδώσει το μέγιστο διαγνωστικό όφελος. Τέλος, απαιτείται εξοικείωση των κλινικών ιατρών με τα πλεονεκτήματα αλλά και τις αδυναμίες των μεθόδων, ώστε να γίνεται σωστή χρήση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Byington CL, Castillo H, Gerber K, Daly JA, Brimley LA, Adams S, et al. The effect of rapid respiratory viral diagnostic testing on antibiotic use in a children's hospital. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156: 1230-1234.
2. Arnold SR, Allen UD, Al-Zahrani M, Tan DH, Wang EE. Antibiotic prescribing by pediatricians for respiratory tract infection in children. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 312-317.
3. Le Saux N, Bjornson C, Pitters C. Antimicrobial use in febrile children diagnosed with respiratory tract illness in an emergency department. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 1078-1080.
4. Price CP. Point of care testing. *BMJ* 2001; 322: 1285-1288.
5. Myint S. Recent advances in the rapid diagnosis of respiratory tract infection. *Br Med Bull* 2002; 61: 97-114.
6. Couch RB, Kasel JA, Glezen WP, Cate TR, Six HR, Taber LH, et al. Influenza: its control in persons and populations. *J Infect Dis* 1986; 153: 431-440.
7. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344: 1917-1928.
8. Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis* 2001; 183: 16-22.
9. Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: S6-10.
10. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 2006; 118: 1774-1793.
11. Henrickson KJ, Hall CB. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: S36-40.
12. World Health Organization. Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. WHO, 2006. (Accessed 23 March, 2008, at www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/rapid_testing/en/index.html.)
13. Center for Diseases Control. Rapid diagnostic testing for influenza. CDC, 2008. (Accessed 23 March, 2008, at www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm.)
14. Grijalva CG, Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, Staat MA, Iwane MK, et al. Accuracy and interpretation of rapid influenza tests in children. *Pediatrics* 2007; 119: e6-11.
15. Ebell MH. Diagnosing and treating patients with suspected influenza. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1789-1792.
16. Weinberg GA. Parainfluenza viruses: an underappreciated cause of pediatric respiratory morbidity. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 447-448.
17. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004; 113: e51-56.
18. Corne JM, Green S, Sanderson G, Caul EO, Johnston SL. A multiplex RT-PCR for the detection of parainfluenza viruses 1-3 in clinical samples. *J Virol Methods* 1999; 82: 9-18.
19. Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4298-4303.
20. Hayashi S, Hogg JC. Adenovirus infections and lung disease. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 237-243.
21. Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, Bingham PG, McDonough MM. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1886-1891.
22. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37: 149-157.
23. Horwitz M. Adenoviruses. In: Fields B, ed. *Virology*. 4th edition Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

24. Xatzipsalti M, Kyrana S, Tsolia M, Psarras S, Bossios A, Laza-Stanca V, et al. Rhinovirus viremia in children with respiratory infections. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1037-1040.
25. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier. RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-724.
26. Principi N, Bosis S, Esposito S. Human metapneumovirus in paediatric patients. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 301-308.

Εξέταση ρινοφαρυγγικού εκκρίματος

Γ. Κατωπόδης, Γ. Συρογιαννόπουλος

Ο ρινοφάρυγγας είναι το σημείο συλλογής των εκκρίσεων που προέρχονται από την κάθαρση της ρινικών κοιλοτήτων, των παραρρίνιων κόλπων και του μέσου ωτός, συμπαράσύροντας μεταξύ άλλων και μικροοργανισμούς (όπως βακτήρια και ιούς), που τυχόν βρίσκονται στις θέσεις αυτές. Οι εκκρίσεις του ρινοφάρυγγα αποτελούν ένα από τα πιο προσιτά υλικά που δύναται να ληφθούν από το αναπνευστικό σύστημα των παιδιών για εξέταση. Η λήψη πτυέλων ή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ή υγρού από το μέσο αυτί είναι πιο δύσκολες ιατρικές πράξεις.

Από νωρίς στη ζωή του παιδιού, ο ρινοφάρυγγας αποικίζεται από ποικιλία μικροοργανισμών, οι οποίοι αποτελούν και τη φυσιολογική χλωρίδα. Η χλωρίδα του ρινοφάρυγγα ποικίλει ανάλογα με την περιοχή από την οποία λαμβάνεται το δείγμα. Το αρχικό τμήμα του ρινοφάρυγγα αποικίζεται κυρίως από σταφυλόκοκκο, ενώ στο μέσο τμήμα συνυπάρχουν τόσο μη παθογόνοι αερόβιοι και αναερόβιοι μικροοργανισμοί, όσο και δυνητικά παθογόνα μικρόβια του αναπνευστικού, όπως ο *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος), ο *Haemophilus influenzae* και η *Moraxella catarrhalis*.^{1,2} Ο οπίσθιος ρινοφάρυγγας χαρακτηρίζεται από φυσιολογική χλωρίδα παρόμοια με αυτή του στοματοφάρυγγα, στην οποία κυριαρχούν α- και β- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι και αναερόβια.

Η εξέταση του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος προσφέρει σημαντικές πληροφορίες στη διάγνωση τόσο των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος,³⁻⁵ όσο και στη διάγνωση ορισμένων βακτηριακών λοιμώξεων, όπως ο κοκκύτης.^{6,7} Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση επιδημιολογικών μελετών (Πίνακας 1).

ΛΗΨΗ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟΥ ΕΚΚΡΙΜΑΤΟΣ

Η προσέγγιση του ρινοφάρυγγα μπορεί να γίνει είτε μέσω των ρινικών χοανών, είτε μέσω της στοματικής κοιλότητας. Η λήψη του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος μέσω των ρινικών χοανών θεωρείται η πιο κατάλληλη, καθώς σχετίζεται με μεγαλύτερη ευαισθησία.^{3,8}

Η λήψη του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος γίνεται με την αναρρόφηση, την έκπλυση του ρινοφάρυγγα ή με τη μορφή επιχρίσματος. Ο τρόπος λήψης είναι σε σημαντικό βαθμό καθοριστικός για την ευαισθησία της εξέτασης. Επειδή η λήψη ρινοφαρυγγικού εκκρίματος δεν αποτελεί πρακτική ρουτίνα στην καθημερινή κλινική πράξη, απαιτείται η εκπαίδευση του λήπτη.

- Η αναρρόφηση του εκκρίματος γίνεται με την εισαγωγή ενός λεπτού ελαστικού καθετήρα μέσω της ρινικής κοιλότητας, σε βάθος περίπου 5-7 cm ή ανάλογο με την απόσταση της μύτης από το ωτικό πτερύγιο.³ Στη συνέχεια, γίνεται ήπια μηχανική αναρρόφηση

Πίνακας 1. Η εξέταση του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος

A. Διάγνωση λοιμώξεων

Ιοί	Απομόνωση ιού Ταχεία ανίχνευση αντιγόνου PCR
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Καλλιέργεια, PCR
Χλαμύδια	Καλλιέργεια, PCR, ανοσοενζυμική μέθοδος ή άμεσος ανοσοφθορισμός
Κοκκύτης	Καλλιέργεια Άμεσος ανοσοφθορισμός PCR

B. Επιδημιολογικές μελέτες

Επιδημιολογία των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού

Μελέτη των στελεχών που κυκλοφορούν στην κοινότητα (πνευμονιόκοκκος,
Haemophilus influenzae, *Moraxella catarrhalis*)

Μελέτη της αντοχής στα αντιβιοτικά των κοινών παθογόνων του αναπνευστικού

και ο καθετήρας απομακρύνεται. Η διαδικασία πρέπει να διαρκεί το πολύ 10 sec και η συλλογή 0,5 ml υλικού είναι ικανοποιητική. Αν δεν αναρροφηθεί υλικό μέσα στο δοχείο συλλογής, τότε ο καθετήρας μπορεί να ξεπλυθεί με ορό ώστε να ληφθεί το περιεχόμενό του ή κόβεται το τμήμα του το οποίο έχει εισέλθει στο ρινοφάρυγγα και αποστέλλεται στο Εργαστήριο.

- Για την λήψη του ρινοφαρυγγικού εκπλύματος, γίνεται ελαφρά κλίση της κεφαλής προς τα πίσω (σε γωνία περίπου 70°) και ενστάλλαξη 1-2 ml ορού μέσα στην ρινική κοιλότητα με μια σύριγγα. Στη συνέχεια ο ασθενής σκύβει μπροστά και το έκπλυμα συλλέγεται σε ένα αποστειρωμένο δοχείο ή τρυβλίο petri. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και στην άλλη ρινική κοιλότητα.
- Η λήψη του ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος γίνεται με τη χρήση αποστειρωμένου εύκαμπτου στυλεού, ο οποίος εισάγεται στη ρινική κοιλότητα παράλληλα προς την υπερώα και προωθείται μέχρι τον ρινοφάρυγγα. Στη θέση αυτή, ο στυλεός παραμένει για λίγα δευτερόλεπτα και περιστρέφεται ώστε να απορροφήσει εκκρίσεις. Στη συνέχεια, απομακρύνεται και τοποθετείται σε κατάλληλο υλικό για να μεταφερθεί στο Εργαστήριο. Η λήψη επιχρίσματος είναι πιο εύκολη, λιγότερο δυσάρεστη και δεν απαιτεί ειδικές συσκευές, σε σχέση με την λήψη αναρρόφησης ή εκπλύματος.³

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Η εξέταση του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος είναι πολύ σημαντική στην αιτιολογική διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού.^{3-5, 9-14} Ως γενικός κανόνας, η λήψη του είναι προτιμότερο να γίνεται με έκπλυση ή αναρρόφηση,⁵ επειδή έτσι συλλέγεται μεγαλύτερη ποσότητα υλικού και το ιικό φορτίο είναι μεγαλύτερο απ' ό,τι σε δείγμα που έχει ληφθεί με επιχρίσμα.

Η ευαισθησία του ρινικού επιχρίσματος για την απομόνωση του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV) έχει βρεθεί ότι ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του δείγματος που είχε ληφθεί με αναρρόφηση.³ Σε άλλη μελέτη, η ευαισθησία του ρινικού επιχρίσματος για τη διάγνωση της λοίμωξης από RSV με ανοσοενζυμική μέθοδο ήταν περίπου 30% μικρότερη,

σε σχέση με τη λήψη ρινοφαρυγγικού εκκρίματος με αναρρόφηση.⁹

Για ορισμένους άλλους αναπνευστικούς ιούς, όπως οι ρινοϊοί, οι ιοί της γρίπης και της παραγρίπης, οι αδενοϊοί, οι εντεροϊοί και ο ιός του απλού έρπητα, έχει προταθεί ότι το ρινικό επίχρισμα δεν υπολείπεται σημαντικά από το δείγμα που έχει ληφθεί με αναρρόφηση. Για τους ιούς αυτούς, οι Heikkinen και συν έδειξαν ότι η ευαισθησία του επιχρίσματος που είχε ληφθεί με συλεό από τη ρινική κοιλότητα ήταν παρόμοια με αυτή του δείγματος από αναρρόφηση.³

Κλασσική εξέταση για τη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος αποτελεί η απομόνωση του ιού από κυτταροκαλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος.¹⁰ Γενικά, η λήψη του δείγματος είναι σκόπιμο να γίνεται κατά την αρχική, οξεία εμπύρετη φάση της λοίμωξης, επειδή η καθυστερημένη λήψη μετά την πρώτη εβδομάδα μειώνει την πιθανότητα για την ανεύρεση ζωντανών ιών. Η καλλιέργεια για ιούς απαιτεί ειδικό ιολογικό εργαστήριο και πρακτικά ενδείκνυται είτε σε επιλεγμένα περιστατικά, είτε στα πλαίσια επιδημιολογικής μελέτης. Σημαντικό μειονέκτημα της καλλιέργειας είναι ότι απαιτείται συνήθως χρονικό διάστημα 2 έως 10 ημερών για την ολοκλήρωσή της. Το γεγονός αυτό περιορίζει τη χρησιμότητά της στην καθημερινή κλινική πράξη.¹⁰ Η νεότερη μέθοδος της ταχείας καλλιέργειας (shell vial culture) με την χρήση μίγματος δύο κυτταρικών σειρών, σε συνδυασμό με ανοσοφθορισμό, έχει ευαισθησία ανάλογη ή και καλύτερη από την κλασσική κυτταροκαλλιέργεια και παράλληλα, το σημαντικό πλεονέκτημα, ότι τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μέσα σε 24 - 48 ώρες.¹¹

Με δεδομένο ότι η καλλιέργεια απαιτεί περισσότερο χρόνο, υπάρχει η τάση να χρησιμοποιούνται στα Εργαστήρια διαγνωστικές μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης του αντιγόνου, όπως ο άμεσος ανοσοφθορισμός (Direct fluorescent antibody, DFA) ή η ενζυμο-ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA).^{10,12} Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται σε δείγματα που λαμβάνονται από το ρινοφάρυγγα. Η ευαισθησία τους εξαρτάται από την καταλληλότητα του δείγματος και την εμπειρία αυτού που πραγματοποιεί την εξέταση και συνήθως κυμαίνεται από 70-95%.¹⁰ Τα συμπεράσματα από μερικές μελέτες αναφέρουν ότι οι μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης του αντιγόνου μπορούν να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την κυτταροκαλλιέργεια, αλλά όχι σε αντικατάστασή της.¹²

Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος (Binax NOW) είναι μια νεότερη ταχεία διαγνωστική μέθοδος. Χρησιμοποιείται για την διάγνωση της λοίμωξης από RSV σε ρινοφαρυγγικό έκκριμα που λαμβάνεται με αναρρόφηση ή έκπλυση, με ευαισθησία 74% και άνω και ειδικότητα 100%.¹³

Οι νεότερες τεχνικές μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται όλο και πιο ευρέως για την ανίχνευση ιών στο αναπνευστικό σύστημα και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για ιούς οι οποίοι απομονώνονται δύσκολα από κυτταροκαλλιέργεια, όπως οι ρινοϊοί και ο ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός.¹⁴ Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί ταχεία μέθοδο με πολύ υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, η οποία υπερβαίνει την αντίστοιχη των κλασσικών μεθόδων της καλλιέργειας και του ανοσοφθορισμού.⁴ Το πρόβλημα του αυξημένου κόστους περιορίζεται σημαντικά με την multiplex PCR, με την οποία μπορεί να γίνει ταυτόχρονα έλεγχος για πολλούς διαφορετικούς ιούς στο ίδιο δείγμα, όπως RSV, ρινοϊούς, κοροναϊούς, ιούς γρίπης Α και Β, ιούς παραγρίπης 1,2 και 3, αδενοϊούς, καθώς και νεότερους ιούς όπως ο ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός.^{4,14}

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΟΚΚΥΤΗ

Η διάγνωση του κοκκύτη επιβεβαιώνεται με την εξέταση του ρινοφαρυγγικού εκκρίμα-

τος. Το πιο κατάλληλο δείγμα θεωρείται αυτό το οποίο έχει ληφθεί με αναρρόφηση, ενώ η λήψη ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος είναι αποδεκτή, ιδιαίτερα στα μεγαλύτερα παιδιά και τους εφήβους.⁷ Η *Bordetella pertussis* εμφανίζει τροπισμό για το κροσσώτο αναπνευστικό επιθήλιο, γι' αυτό η λήψη φαρυγγικού επιχρίσματος δεν θεωρείται κατάλληλο δείγμα.

Η καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος αποτελεί την κλασική μέθοδο για τη μικροβιολογική τεκμηρίωση της διάγνωσης του κοκκύτη. Αν και χαρακτηρίζεται από ειδικότητα 100%, η ευαισθησία της εξέτασης αυτής κυμαίνεται από 30-60%.^{6,7} Η λήψη κατάλληλου δείγματος από τον ρινοφάρυγγα είναι σημαντική και πρέπει να γίνεται κατά το καταρροϊκό και κατά την αρχή του παροξυσμικού σταδίου,¹⁵ ώστε να περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων. Συνήθως όμως, η υποψία της νόσου τίθεται αργότερα, κατά τη διάρκεια του παροξυσμικού σταδίου, οπότε και εμφανίζονται τα τυπικά συμπτώματα του κοκκύτη. Η λήψη μετά την 3^η εβδομάδα από την έναρξη του βήχα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα να μην θετικοποιηθεί η καλλιέργεια. Παρόμοιο αποτέλεσμα μπορεί να έχει και η προηγηθείσα λήψη αντιμικροβιακής αγωγής (μακρολίδες, κοτριμοξαζόλη, τετρακυκλίνες).¹⁵ Τέλος, για την λήψη επιχρίσματος για καλλιέργεια περισσότερο κατάλληλοι θεωρούνται στυλεοί με άκρον αλγινικού ασβεστίου ή Dacron, ενώ οι απλοί βαμβακοφόροι στυλεοί έχουν πτωχά αποτελέσματα (πιθανόν λόγω της περιεκτικότητας λιπαρών οξέων τα οποία είναι τοξικά για την *B. pertussis*).¹⁶ Η καλλιέργεια απαιτεί ειδικό θρεπτικό υλικό όπως είναι τα υλικά Bordet-Gengou ή Regan-Lowe.¹⁵ Η *B. pertussis* αναπτύσσεται συνήθως σε 3-4 ημέρες, ωστόσο η καλλιέργεια δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αρνητική πριν από τη συμπλήρωση 10 ημερών.

Η ανίχνευση της *B. pertussis* στις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις με άμεσο ανοσοφθορισμό (Direct fluorescent antibody, DFA) μπορεί να γίνει σε λίγες ώρες, αλλά απαιτεί την εμπειρία αυτού που πραγματοποιεί την εξέταση. Χαρακτηρίζεται από χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία (40-75% ανάλογα με το Εργαστήριο) και δεν συστήνεται για την εργαστηριακή τεκμηρίωση του κοκκύτη, παρά μόνο σε συνδυασμό με καλλιέργεια ή PCR.^{6,15} Επιπλέον, το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων με τη φυσιολογική χλωρίδα του ρινοφάρυγγα, φθάνει μέχρι και 44%.⁶

Η ανίχνευση της *B. pertussis* με PCR σε δείγμα που λαμβάνεται από το ρινοφάρυγγα χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, η οποία είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την καλλιέργεια ή τον ανοσοφθορισμό.^{15,17} Ιδιαίτερα, σε άτομα με ιστορικό εμβολιασμού ή πρόσφατης επαφής με άτομο που νοσεί από κοκκύτη, καθώς και σε περιπτώσεις που το δείγμα ληφθεί κατά το παροξυσμικό στάδιο της νόσου ή μετά από τη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής, συχνά η καλλιέργεια είναι αρνητική και η PCR θετική.¹⁵ Σε μια μελέτη, ενώ η χορήγηση ερυθρομυκίνης για μια εβδομάδα είχε ως αποτέλεσμα την αρνητική καλλιέργεια σε όλους τους ασθενείς με κοκκύτη, το 56% αυτών είχαν θετική PCR.¹⁸ Επίσης, η ευαισθησία της PCR είναι υψηλότερη στα νεογνά και τα βρέφη.^{15,17} Στους εφήβους και τους ενήλικους, η ευαισθησία της PCR εξαρτάται από την χρονική διάρκεια του βήχα και το βακτηριακό φορτίο στο ρινοφάρυγγα και γενικά είναι μικρότερη του 50%. Για την λήψη του δείγματος πρέπει να χρησιμοποιούνται στυλεοί με άκρες από Dacron ή ρεγιόν (rayon) και όχι από αλγινικό ασβέστιο, το οποίο αποτελεί αναστολέα της PCR.¹⁶

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Η απομόνωση του *M. pneumoniae* μπορεί να γίνει από το ρινοφάρυγγα, το φάρυγγα, το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, τα πτύελα ή το πλευριτικό υγρό. Η λήψη πτυέλων στους ενήλικες έχει καλύτερα αποτελέσματα στη διάγνωση της μυκοπλάσματικής λοίμωξης, όμως στα παιδιά δεν είναι δυνατή.¹⁹ Η καλλιέργεια για *M. pneumoniae* απαιτεί ειδικά θρεπτικά υλικά

και έχει χαμηλή ευαισθησία, η οποία συγκριτικά με την PCR είναι περίπου 60%.²⁰ Επιπλέον, η καλλιέργεια είναι βραδεία καθώς χρειάζονται μέχρι και 21 ημέρες για την ολοκλήρωσή της. Τέλος, επειδή το *M. pneumoniae* μπορεί να παραμείνει στο ανώτερο αναπνευστικό για αρκετές εβδομάδες, η απομόνωσή του δεν υποδηλώνει πάντα ότι αποτελεί και το αίτιο της οξείας λοίμωξης.

Η PCR σε δείγμα που λαμβάνεται από το ρινοφάρυγγα με αναρρόφηση ή σε φαρυγγικό επίχρισμα θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος για τη ανίχνευση του *M. pneumoniae* και χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, έως και 95%.¹⁹

ΧΛΑΜΥΔΙΑ

Η εξέταση του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος χρησιμοποιείται στη διάγνωση των λοιμώξεων από χλαμύδια. Το *Chlamydia pneumoniae* μπορεί να απομονωθεί από το ρινοφάρυγγα και προτιμάται η λήψη επιχρίσματος με στυλεό, το άκρο του οποίου είναι από Dacron.²¹ Άλλα κατάλληλα δείγματα από αναπνευστικό είναι το φαρυγγικό επίχρισμα, τα πτύελα, το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή το πλευριτικό υγρό, εάν υπάρχει. Η ανίχνευση του *C. pneumoniae* με PCR σε υλικό από το ρινοφάρυγγα αποτελεί ευαίσθητη και ειδική μέθοδο, όμως μπορεί να υποδηλώνει απλή φορεία και όχι το πραγματικό αίτιο οξείας λοίμωξης.

Επίσης, η απομόνωση του *Chlamydia trachomatis* μπορεί να γίνει από το ρινοφάρυγγα. Η ανίχνευσή του μπορεί να γίνει και με ανοσοενζυμικές μεθόδους ή άμεσο ανοσοφθορισμό σε δείγμα από το ρινοφάρυγγα, αν και η ευαισθησία των μεθόδων αυτών είναι σημαντικά υψηλότερη αν το υλικό ληφθεί από τους επιπεφυκότες.²¹

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΟΙΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Οι πνευμονιόκοκκος, ο *H. influenzae* και η *M. catarrhalis* αποτελούν σημαντικά αίτια λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποικίζουν κατεξοχήν τον ρινοφάρυγγα των παιδιών και από εκεί μπορεί να μετακινηθούν σε παρακείμενες θέσεις του αναπνευστικού συστήματος προκαλώντας λοιμώξεις, όπως οξεία μέση ωτίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα και πνευμονία ή, στη περίπτωση του πνευμονιόκοκκου, να διεισδύσουν σε στείρες θέσεις προκαλώντας διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως η βακτηριαιμία και η μηνιγγίτιδα.¹ Φορείς μπορεί να είναι τόσο υγιή άτομα, όσο και άτομα με συμπτώματα οξείας λοίμωξης, η οποία πιθανόν ή αποδεδειγμένα οφείλεται στο συγκεκριμένο παθογόνο. Αρκετοί παράγοντες επιδρούν στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα των παιδιών (Πίνακας 2).

Εκτός από την πιθανή πρόκληση νόσου, η φορεία των μικροοργανισμών αυτών στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα έχει ως αποτέλεσμα και την μετάδοσή τους από άτομο σε άτομο μέσω των αναπνευστικών εκκρίσεων, οδηγώντας έτσι στη διασπορά τους στην κοινότητα.¹

Η καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την διενέργεια επιδημιολογικών μελετών, ενώ η χρησιμότητά τους στην διάγνωση των λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος είναι περιορισμένη.

Πνευμονιόκοκκος

Ο ρινοφάρυγγας αποτελεί την οικολογική φωλιά του πνευμονιόκοκκου. Ο πνευμονιόκοκκος αποικίζει το ρινοφάρυγγα από τους πρώτους μήνες της ζωής και τουλάχιστον τα μισά παιδιά

Πίνακας 2. Παράγοντες που επιδρούν στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο, *Haemophilus influenzae* ή *Moraxella catarrhalis*.

Παράγοντας	Επίδραση στη φορεία
Ηλικία	Αύξηση στα πρώτα 2-3 χρόνια ζωής, στη συνέχεια σταδιακή μείωση
Κοινωνικο-οικονομική κατάσταση	Αύξηση σε χαμηλές κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες
Εποχή	Αποικισμός παρατηρείται σε όλες τις εποχές, αλλά σε υψηλότερο ποσοστό κατά τον χειμώνα
Παθητικό κάπνισμα	Έχει συσχετιστεί με αύξηση
Έκθεση σε περιβάλλον με άλλα παιδιά	Αύξηση σε συνθήκες συνωστισμού, σε παρακολούθηση βρεφονηπιακού σταθμού, σε πολυμελείς οικογένειες
Λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού	Αύξηση της φορείας Σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια ΟΜΩ Αύξηση σε παιδιά επιρρεπή σε ΟΜΩ
Θεραπεία με αντιβιοτικά	Μείωση κατά τη διάρκεια και λίγο μετά τη θεραπεία Αύξηση του αποικισμού με ανθεκτικά στελέχη

ΟΜΩ: Οξεία μέση ωτίτιδα

έχουν αποικιστεί, μια ή περισσότερες φορές, στον πρώτο χρόνο της ζωής τους.¹

Μελέτες στα παιδιά έχουν δείξει ότι το δείγμα από το ρινοφάρυγγα υπερτερεί του δείγματος που λαμβάνεται από το στοματοφάρυγγα για την ανάδειξη των φορέων του πνευμονιόκοκκου. Οι Greenberg και συν έδειξαν ότι η καλλιέργεια επιχρίσματος από τον στοματοφάρυγγα ήταν θετική μόνο στο ένα τέταρτο των παιδιών κάτω των 5 ετών, τα οποία ήταν φορείς του πνευμονιόκοκκου.² Η λήψη του δείγματος με αναρρόφηση αποτελεί τον ιδανικό τρόπο λήψης του δείγματος, αν και για παιδιά χωρίς αύξηση των εκκρίσεων η λήψη επιχρίσματος είναι κατάλληλη. Αντίθετα με τα παιδιά, στους ενήλικους η λήψη επιχρίσματος από το στοματοφάρυγγα δεν φαίνεται να υπολείπεται της λήψης ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος.²

H. influenzae

Ο *H. influenzae* αποικίζει εξίσου το ρινοφάρυγγα και το στοματοφάρυγγα των παιδιών, αλλά είναι δυνατό να βρίσκεται μόνο στο στοματοφάρυγγα.² Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα αυξάνει ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια οξείας λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος. Όπως και για τον πνευμονιόκοκκο, ο καλύτερος τρόπος λήψης του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος είναι με αναρρόφηση, ενώ η λήψη επιχρίσματος από τον στοματοφάρυγγα είναι αποδεκτή, ιδίως στα μεγαλύτερα παιδιά.²

ΟΞΕΙΑ ΜΕΣΗ ΩΤΙΤΙΔΑ, ΠΑΡΑΡΡΙΝΟΚΟΛΠΙΤΙΔΑ, ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ

Η διάγνωση του αιτιολογικού παράγοντα της οξείας μέσης ωτίτιδας (ΟΜΩ) απαιτεί την λήψη υγρού από το μέσο αυτί με τυμπανοκέντηση, η οποία αποτελεί μια επεμβατική πράξη με σημαντικές δυσκολίες στην εφαρμογή της. Αν και δεν χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη,

αρκετές μελέτες έχουν εκτιμήσει την αξία της καλλιέργειας ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος για τη διάγνωση του αιτίου της ΟΜΩ, με αντικρουόμενα αποτελέσματα.^{22,23}

Σύμφωνα με μερικές μελέτες, η καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος μπορεί να αποτελέσει μια καλή ένδειξη του αιτίου της ΟΜΩ, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τα κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα. Οι Syrjanen και συν έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αποικιών στην καλλιέργεια ρινοφαρυγγικού εκκρίματος που λαμβάνεται με αναρρόφηση, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να βρίσκεται το ίδιο παθογόνο στο μέσο αυτί.²² Αντίθετα, όταν δεν απομονώνεται πνευμονιόκοκκος ή *H. influenzae* από το ρινοφάρυγγα κατά την διάρκεια μια ΟΜΩ, είναι απίθανο τα συγκεκριμένα παθογόνα να βρίσκονται στο μέσο αυτί.

Αρκετές άλλες μελέτες όμως έχουν δείξει ότι η καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος είναι μη ειδική εξέταση, με χαμηλή προγνωστική αξία για την τεκμηρίωση του αιτίου της ΟΜΩ.²³ Συμπερασματικά, η καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος δεν έχει καθιερωθεί και δεν συνιστάται για την αιτιολογική διάγνωση της ΟΜΩ. Σε περιπτώσεις ΟΜΩ που δεν ανταποκρίνονται στην αντιμικροβιακή αγωγή, η λήψη υγρού από το μέσο αυτί με τυμπανοκέντηση είναι σαφώς η καλύτερη επιλογή.

Ανάλογες μελέτες, έχουν δείξει επίσης ότι η καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος δεν είναι χρήσιμη στην αιτιολογική διάγνωση της παραρρινοκολπίτιδας.²⁴

Τέλος, αν και τόσο ο πνευμονιόκοκκος όσο και ο *H. influenzae* απομονώνονται από τον φάρυγγα παιδιών με πνευμονία σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τα παιδιά χωρίς πνευμονία,²⁵ δεν έχει αποδειχθεί καμία χρησιμότητα της καλλιέργειας του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος στην αιτιολογική διάγνωση και αντιμετώπιση της βακτηριακής πνευμονίας.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η εξέταση του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος έχει χρησιμοποιηθεί στην πραγματοποίηση επιδημιολογικών μελετών που αφορούν στα αίτια των λοιμώξεων του αναπνευστικού, ιδιαίτερα στο ρόλο των διαφόρων ιών.

Επίσης, οι μελέτες της φορείας των δυνητικά παθογόνων μικροβίων στον ρινοφάρυγγα δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τα στελέχη που κυκλοφορούν στην κοινότητα και προκαλούν λοιμώξεις, ιδιαίτερα στο αναπνευστικό σύστημα, αλλά και για την αντοχή των στελεχών αυτών στα αντιβιοτικά (CDC, WHO). Η αξία του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος σε επιδημιολογικές μελέτες είναι αναμφισβήτητη εφόσον το δείγμα της μελέτης είναι μεγάλο, εκτείνεται σε μεγάλη χρονική περίοδο, εάν είναι δυνατόν 2 ή περισσότερα χρόνια και καλύπτει μεγάλη γεωγραφική περιοχή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. García-Rodríguez JA, Martínez MJF. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. J Antimicrob Chemother 2002; 50: S2 59-73.
2. Greenberg D, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R. Relative importance of nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae from healthy and sick individuals varies with age. J Clin Microbiol 2004;

42: 4604-4609.

3. Heikkinen T, Mattila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4337-4339.
4. Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2779-2783.
5. McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 151-164.
6. Halperin SA, Bortolussi R, Wort AJ. Evaluation of culture, immunofluorescence, and serology for the diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 752-757.
7. Hallander HO, Reizenstein E, Renemar B, Rasmuson G, Mardin L, Olin P. Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 50-52.
8. Van der Veen EL, Rovers MM, Leverstein-van Hall MA, Sanders EAM, Schilder AGM. Influence of sampling technique on detection of potential pathogens in the nasopharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: 752-755.
9. Stensballe LG, Trautner S, Kofoed P-E, Nante E, Hedegaard K, Jensen IP, et al. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimen for detection of respiratory syncytial virus in different settings in a developing country. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 317-321.
10. Shetty AK, Treynor E, Hill DW, Gutierrez KM, Warford A, Baron EJO. Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 789-794.
11. St George K, Patel NM, Hartwig RA, Scholl DR, Jollick JA, Kauffmann LM et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J Clin Virol* 2002; 24: 107-115.
12. Doing KM, Jerkofsky MA, Dow EG, Jellison JA. Use of fluorescent-antibody staining of cytocentrifuge-prepared smears in combination with cell culture for direct detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2112-2114.
13. Borek AP, Clemens SH, Gaskins VK, Aird DZ, Valsamakis A. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1105-1107.
14. Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, Vreede WB, Pilon J-W, Bruistein SM. Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5596-5603.
15. Müller F-M C, Hoppe JE, Von König CHW. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2435-2443.
16. Cloud JL, Hymas W, Carroll KC. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3838-3840.
17. Riffelman M, Von König CHW, Caro V, Guiso N for the Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4925-4929.
18. Edelman K, Nikkari S, Ruuskanen O, et al. Detection of *Bordetella pertussis* by polymerase chain reaction and culture in the nasopharynx of erythromycin-treated infants with pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 54-57.
19. Waris ME, Toikka P, Saarinen T, Nikkari S, Meurman O, Vainionpää R, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3155-3159.
20. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 263-273.
21. Hammerschlag M R. Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae infections in children and adolescents. *Pediatr Rev* 2004; 25: 43-50.

22. Syrjänen RK, Herva EE, Mäkelä PE, Puhakka HJ, Auranen KJ, Takala AK, et al. The value of nasopharyngeal culture in predicting the etiology of acute otitis media in children less than two years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 1032-1036.
23. Gehanno P, Lenoir G, Barry B, Bons J, Boucot I, Berche P. Evaluation of nasopharyngeal cultures for the assessment of acute otitis media. A prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 329-332.
24. Wald ER. Microbiology of acute and chronic sinusitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 1994;14:31-45.
25. Levine OS, Liu G, Garman RL, Dowell SF, Yu S, Yang YH. *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* as causes of pneumonia among children in Beijing, China. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 165-170.

Ανίχνευση και αξιολόγηση μυκήτων

Η. Ιωσηφίδης, Ε. Ροηλίδης

Η διάγνωση των διεισδυτικών μυκητιασικών λοιμώξεων αποτελεί πρόκληση για τους κλινικούς ιατρούς ιδίως σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή. Η συμβολή του μικροβιολογικού εργαστηρίου στην ανίχνευση των μυκήτων και του εξειδικευμένου κλινικού ιατρού στην αξιολόγηση της ανίχνευσης των μυκήτων σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος είναι ιδιαίτερα σημαντική. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συμβατικές και νεότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και αξιολόγηση μυκήτων.

ΑΠΛΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕ Η ΧΩΡΙΣ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΥΣΤΙΚΟΥ ΚΑΛΙΟΥ

Σε όλα τα κλινικά δείγματα στα οποία υπάρχει υποψία για την ύπαρξη μυκήτων μπορούν να γίνουν απλές και άμεσες εξετάσεις για την ανίχνευσή τους. Ο έλεγχος για μύκητες μπορεί να ξεκινήσει από την μικροσκόπηση ενός ξηρού παρασκευάσματος δείγματος με ή χωρίς τη προσθήκη καυστικού καλίου (ΚΟΗ). Το ΚΟΗ βοηθάει στην καλύτερη εμφάνιση των μυκήτων καθώς καταστρέφει τα στοιχεία του παρασκευάσματος με εξαίρεση τους μύκητες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα δομικά υλικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων υπάρχει μια ουσία, η χιτίνη, η οποία δίνει προσωρινή προστασία του κυττάρου στη δράση του ΚΟΗ, αντίθετα με τα υπόλοιπα κύτταρα και ουσίες που διαλύονται απευθείας.^{1,2}

Ειδικά για το αναπνευστικό σύστημα η απλή μικροσκόπηση μπορεί να εφαρμοσθεί στα πτύελα καθώς και σε όλες τις άλλες εκκρίσεις από το κατώτερο αναπνευστικό όπως επίσης και σε υλικά που προέρχονται από βιοψία (μέσω βρογχοσκόπησης ή υλικού διαδερμικής αναρρόφησης από τον πνεύμονα).

Εκτός από την δυνατότητα ανίχνευσης μυκήτων (παρουσία ή όχι στο παρασκεύασμα), η άμεση μικροσκόπηση μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες για το είδος του μύκητα, ιδίως όταν υπάρχει σημαντική εμπειρία από το προσωπικό που την εφαρμόζει. Εάν στο παρασκεύασμα υπάρχουν ταυτόχρονα στο οπτικό πεδίο ζύμες και υφές, είναι πολύ πιθανό ότι ο μύκητας αυτός είναι *Candida albicans* (ή άλλα είδη *Candida*). Η εμφάνιση λεπτών υφών με διαφράγματα που διακλαδίζονται με οξείες γωνίες είναι ενδεικτική της παρουσίας *Aspergillus* spp. Παχιές υφές χωρίς διαφράγματα, σαν ταινίες που έχουν διακλαδώσεις σε ορθή γωνία είναι ενδεικτικές για ζυγομύκητες. Ένας πολύ μικρός μύκητας που βρίσκεται ενδοκυττάρια πολύ πιθανό να είναι *Histoplasma capsulatum*, γιατί είναι πάρα πολύ λίγοι μύκητες σε αυτό το μέγεθος που υπάρχουν ενδοκυττάρια. Η εύρεση σφαιρικών σωματιδίων με ενδοσπόρια είναι ουσιαστικά παθογνωμονική για *Coccidioides immitis* κλπ.³

Επομένως, η άμεση μικροσκόπηση αποτελεί ταχεία μέθοδο ανίχνευσης μυκήτων με απλές διαδικασίες και χαμηλό κόστος. Παρόλα αυτά υπάρχουν σαφή μειονεκτήματα όπως είναι η χαμηλή ευαισθησία της καθώς και η αδυναμία οριστικής διάκρισης των μυκήτων σε επίπεδο είδους.¹

ΧΡΩΣΕΙΣ ΑΜΕΣΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ

Μια σειρά από χρώσεις είτε απλές είτε ειδικές για μύκητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευσή τους στα παρασκευάσματα (Πίνακας 1). Η χρώση Gram ως εξέταση ρουτίνας πρέπει να χρησιμοποιείται, αλλά ασφαλώς υπάρχουν περισσότερο ειδικές και ευαισθητές χρώσεις.^{1,2,4}

Η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση νηματοειδών μυκήτων. Παρόλα αυτά υπάρχουν σαφώς δυσκολίες με τη χρώση αυτή καθώς είναι δύσκολη η διάκριση των μυκήτων από τα υπόλοιπα στοιχεία του παρασκευάσματος. Οι ειδικές χρώσεις για τους μύκητες είναι η χρώση Gomori's methenamine silver stain (GMS) και η periodic acid-Schiff (PAS). Οι χρωστικές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε δείγματα πτυέλων ή BAL όσο και σε ιστοτεμάχια (ιστοπαθολογική εξέταση όπως συζητείται παρακάτω). Με τη χρώση PAS υπάρχει η δυνατότητα στο οπτικό πεδίο εκτός από το μύκητα (που φαίνεται με κόκκινο χρώμα) να διακριθούν και λεπτομέρειες γύρω από αυτόν (κύτταρα, ιστοί). Το γεγονός αυτό μπορεί να δώσει αρκετές πληροφορίες για την αξιολόγηση του ευρήματος. Η παρουσία δηλαδή κυττάρων του αμυντικού συστήματος είναι ενδεικτική της απάντησης του ξενιστή προς το μύκητα. Αντίθετα, με τη χρώση GMS ουσιαστικά δεν διαγράφονται οι λεπτομέρειες του υπόλοιπου παρασκευάσματος, και οι μύκητες απεικονίζονται με μαύρο χρώμα προσδίδοντας στην εξέταση αυτή καλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευσή τους. Επομένως και οι δύο χρώσεις θεωρούνται απαραίτητες και μάλιστα συμπληρωματικές μεταξύ τους για την ανίχνευση μυκήτων.^{2,4,5}

Εκτός από τις παραπάνω χρωστικές για χρήση στο κοινό μικροσκόπιο υπάρχουν ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό. Παραδείγματα αποτελούν οι χρωστικές calcofluor white, Uvitex 2B και Blankophor που με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού μπορούν να συμβάλουν στην ανίχνευση μυκήτων σε κλινικά δείγματα από το αναπνευστικό σύστημα. Το μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι απαιτείται η ύπαρξη ειδικού μικροσκοπίου φθορισμού.^{2,4,5}

Πίνακας 1. Μικροσκοπική εξέταση για την ανίχνευση μυκήτων σε διάφορα παρασκευάσματα.

Μικροσκοπική εξέταση	Πτύελα/BAL	Ιστοτεμάχιο
Χωρίς χρώση	Ξηρό παρασκεύασμα με ή χωρίς KOH	
Κλασικές χρώσεις	Gram	Αιματοξυλίνη-ηωσίνη
Ειδικές χρώσεις για μύκητες	Gomori methenamine silver (GMS) Periodic acid-Schiff (PAS)	Gomori methenamine silver (GMS) Periodic acid-Schiff (PAS)
Χρωστικές ουσίες φθορισμού	Calcofluor white Uvitex 2B Blankophor	

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η ιστοπαθολογική εξέταση των υλικών βιοψίας που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα και έχουν παρθεί με διάφορους τρόπους (βρογχοσκόπηση, διαδερμική προσπέλαση με βελόνη, ανοικτή βιοψία, κλπ.) αποτελεί έναν από τους πιο αξιόπιστους τρόπους επιβεβαίωσης της λοίμωξης από μύκητα.

Με τις κοινές χρώσεις που χρησιμοποιούνται (αιματοξυλίνη-ηωσίνη) υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης μυκήτων όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Επειδή όμως αρκετοί μύκητες μπορεί να μη χρωματιστούν σωστά με αυτές τις χρώσεις, χρησιμοποιούνται πιο ειδικές χρώσεις, όπως για παράδειγμα GMS, PAS, Fontana-Masson, Gridley's stain κλπ. Με τη βοήθεια αυτών των χρώσεων είναι δυνατή η ανίχνευση των μυκήτων και η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Ο καθορισμός του είδους του μύκητα είναι στις περισσότερες φορές δύσκολος έως και αδύνατος. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την ανίχνευση συγκεκριμένων μυκήτων σε υλικά που προέρχονται από ιστούς. Μερικές από τις τεχνικές αυτές χρησιμοποιούν ειδικά μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα (π.χ. για τον ασπεργίλλο χρησιμοποιούνται τα αντισώματα WF-AF-1 DAKO, EB-A1) που φαίνεται να έχουν ικανοποιητική ευαισθησία. Υπό μελέτη βρίσκονται τεχνικές που ανιχνεύουν ειδικά γονίδια μυκήτων απευθείας στο υλικό βιοψίας.^{1-3,5,6}

Συμπερασματικά, η μέθοδος αυτή αποτελεί μια σχετικά γρήγορη δοκιμασία, με χαμηλό κόστος, και δυνατότητα παράλληλης μελέτης ύπαρξης μυκήτων και αντίδρασης των κυττάρων του ξενιστή. Ειδικά για την σίγουρη και οριστική διάγνωση των διεισδυτικών πνευμονικών μυκητιάσεων (π.χ. ασπεργίλλωσης) απαιτείται ιστοπαθολογική επιβεβαίωση, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την Έρευνα και Θεραπεία του Καρκίνου και την Ομάδα Μελέτης των Μυκητιάσεων (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group, EORTC/MSG).^{7,8}

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η ανάπτυξη ενός μύκητα στα καλλιεργητικά υλικά αποτελεί ένα από τους πιο αξιόπιστους τρόπους ανίχνευσής του. Οι περισσότεροι από τους κλινικά σημαντικούς μύκητες αναπτύσσονται στα κοινά καλλιεργητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στο μικροβιολογικό εργαστήριο για την απομόνωση των βακτηρίων. Επειδή όμως η ανάπτυξή τους σε αυτά τα υλικά μπορεί να είναι αρκετά αργή, υπάρχουν ειδικά καλλιεργητικά υλικά που διευκολύνουν την ανάπτυξή τους. Μεταξύ αυτών τα πιο κοινά που χρησιμοποιούνται είναι το Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA), Brain-Heart Infusion Agar (BHI) και άλλα ειδικά υλικά. Στα παραπάνω υλικά, ειδικά στην περίπτωση που το υλικό δεν είναι στείρο και αναμένεται η ανάπτυξη βακτηρίων, γίνεται προσθήκη αντιμικροβιακών (π.χ. χλωραμφενικόλη, γενταμικίνη, βανκομυκίνη).^{1,2}

Ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη εξαρτάται από το είδος του μύκητα αλλά και από το καλλιεργητικό υλικό όπως προαναφέρθηκε. Για το λόγο αυτό πολλές φορές χρειάζεται η αναμονή έως και 2 βδομάδες (και σε μερικές περιπτώσεις ακόμη περισσότερο) μέχρι την ανάπτυξη των μυκήτων. Παρόλα αυτά, μύκητες που ανήκουν στα *Candida* spp. και *Aspergillus* spp. αναπτύσσονται συνήθως σε μικρότερο χρονικό διάστημα (1-3 μέρες). Η ταχύτητα ανάπτυξης στα καλλιεργητικά υλικά καθώς και τα μακροσκοπικά (εμφάνιση στην καλλιέργεια) και μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκήτων χρησιμοποιούνται για την καλύτερη τυποποίησή τους.^{1,7}

Στη διαδικασία αξιολόγησης μια θετικής καλλιέργειας με μύκητες λαμβάνονται υπόψη πολλοί παράγοντες. Το είδος του κλινικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια είναι ένας από τους σημαντικούς παράγοντες. Η ανίχνευση μυκήτων σε υλικά που προέρχονται από στείρες περιοχές του σώματος (π.χ. αίμα, πλευριτικό υγρό, διαδερμική βιοψία πνεύμονα) δύσκολα μπορεί να αμφισβητηθεί. Στην περίπτωση όμως που τα βιολογικά δείγματα προέρχονται από περιοχές που δεν είναι στείρες (π.χ. πτύελα, BAL) τότε για την αξιολόγηση της θετικής καλλιέργειας χρειάζονται περισσότερες πληροφορίες. Το είδος του μύκητα που απομονώνεται στην περίπτωση αυτή έχει σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της καλλιέργειας. Η ανίχνευση ορισμένων μυκήτων όπως για παράδειγμα του *H. capsulatum* είναι ουσιαστικά παθογνωμονική για τη διάγνωση της λοίμωξης από αυτόν το μύκητα. Αντίθετα, η ανίχνευση ευκαιριακών μυκήτων όπως είναι *Aspergillus* spp. και *Candida* spp. σε κλινικά δείγματα που δεν είναι στείρα, δε σημαίνει απαραίτητα λοίμωξη από αυτούς τους μύκητες. Έτσι, η ανίχνευση τους π.χ. στα πτύελα μπορεί απλά να σημαίνει αποικισμό και όχι λοίμωξη. Επιπλέον, η αρχική μικροσκόπηση του δείγματος πριν την καλλιέργειά παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αξιολόγηση του αποτελέσματος της καλλιέργειας, ιδιαίτερα για τον αποκλεισμό μια πιθανής επιμόλυνσης του δείγματος. Στοιχεία που αφορούν την κλινική εικόνα και την υποκείμενη νόσο του ασθενή είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την αξιολόγηση μιας θετικής καλλιέργειας μυκήτων σε μη στείρο δείγμα.^{1,2,7}

Ένα από τα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας των μυκήτων είναι η δυνατότητα που παρέχεται μετά την απομόνωσή τους να γίνει έλεγχος της ευαισθησίας τους στα διάφορα αντιμυκητιακά φάρμακα (αντιμυκητόγραμμα). Περαιτέρω εξετάσεις (κυρίως μοριακές) μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την καλύτερη τυποποίηση του μύκητα.⁹ Βέβαια η καλλιέργεια ως μέθοδος ανίχνευσης μυκήτων έχει σαφώς ορισμένους περιορισμούς με σημαντικότερο το σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για να αναπτυχθεί ο μύκητας. Επιπλέον σε μυκητιασικές λοιμώξεις του αναπνευστικού η καλλιέργεια φαίνεται να έχει χαμηλή ευαισθησία στην ανίχνευση μυκήτων ώστε ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει τη λοίμωξη. Παρομοίως, ένα θετικό αποτέλεσμα δε μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ αποικισμού των αεραγωγών και λοίμωξης. Σύμφωνα με τα κριτήρια των EORTC/MSG η θετική καλλιέργεια αποτελεί ένα από τα μικροβιολογικά κριτήρια για τη διάγνωση της διεισδυτικής μυκητίασης.^{7,8}

ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Ορισμένες ορολογικές εξετάσεις έχουν ενταχθεί στη διάγνωση μυκητιασικών λοιμώξεων ως ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης. Διακρίνονται σε αυτές που ανιχνεύουν αντισώματα έναντι μυκήτων και σε αυτές που ανιχνεύουν αντιγόνα μυκήτων.

Η ανίχνευση αντισωμάτων μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές (ELISA, radioimmunoassay, indirect-immunofluoresence, immunodiffusion, complement fixation) έχει όμως περιορισμένη αξία και εφαρμόζεται σε ειδικές περιπτώσεις. Ανίχνευση αντισωμάτων χρησιμοποιείται σε ενδημικές μυκητιάσεις σε ανοσοεπαρκή άτομα όπως είναι η ιστοπλάσμωση και η κοκκιδιοειδομύκωση. Η χρόνια πνευμονική ασπεργίλλωση επίσης είναι μια νόσος στην οποία επίσης η ανεύρεση ειδικών αντισωμάτων κατά του ασπεργίλλου είναι απαραίτητη για τη διάγνωση (π.χ. ειδικά IgG αντισώματα κατά του *Aspergillus fumigatus*, precipitins). Παρόλα αυτά η χρήση των αντισωμάτων για την ανίχνευση των διεισδυτικών μυκητιάσεων έχει περιορισμούς και ιδίως σε άτομα με ανοσοκαταστολή λόγω της φτωχής τους αντισωματικής απάντησης.^{1,2,10}

Σε ότι αφορά την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων των μυκήτων, αυτή φαίνεται να είναι περισσότερο βοηθητική στη διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων. Ήδη η ανίχνευση των ειδικών αντιγόνων που υπάρχουν για τη διάγνωση της κρυπτοκοκκίωσης και της ιστοπλάσμωσης έχουν πλέον καθιερωθεί. Δύο ακόμη αντιγόνα που έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη με καλά αποτελέσματα είναι η 1,3-β- D γλυκάνη (ένα μη ειδικό αντιγόνο) και η γαλακτομαννάνη (ειδικό αντιγόνο ειδών *Aspergillus*) για τα οποία γίνεται περισσότερη ανάλυση στη συνέχεια.^{1,4}

Η 1,3 β-D γλυκάνη αποτελεί συστατικό του τοιχώματος των περισσότερων κλινικά σημαντικών μυκήτων (*Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Pneumocystis*, *Fusarium*, *Acremonium* κλπ.) με εξαίρεση τους ζυγομύκητες και τον *Cryptococcus neoformans* (Πίνακας 2). Για την ανίχνευσή της κυκλοφορεί στο εμπόριο ειδικό τεστ (Glucatell test) που δίνει αποτέλεσμα μέσα σε δύο ώρες. Το όριο αναφοράς που χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή της και έχει καθιερωθεί είναι τα 60 pg/ml, αλλά έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα όρια που κυμαίνονται από 6 έως 80 pg/ml.^{2,4,11}

Η 1,3 β-D γλυκάνη έχει βρεθεί στις μελέτες που έχουν γίνει ότι έχει ειδικότητα περίπου 87% και ευαισθησία 84% που θεωρούνται πολύ καλές σε σχέση με άλλες μεθόδους για τη διάγνωση διεισδυτικών λοιμώξεων από μύκητες. Σε ότι αφορά την προγνωστική αξία της μεθόδου φαίνεται ότι η θετική προγνωστική αξία είναι χαμηλή, της τάξης του 59%, και αυτό διότι μπορεί να είναι θετική και σε βακτηριακές λοιμώξεις, αλλά η αρνητική προγνωστική αξία φθάνει το 97% καθιστώντας την πολύ σημαντική στον αποκλεισμό μυκητιασικών λοιμώξεων σε άτομα υψηλού κινδύνου. Στα νεογνά η χρήση της 1,3 β-D γλυκάνης φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη εξέταση καθώς η διεισδυτική καντιντίαση είναι η πιο συχνή μυκητιασική λοίμωξη.^{4,11,12}

Η γαλακτομαννάνη αποτελεί κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των *Aspergillus* spp. και ο ρόλος της ανίχνευσής της για την διάγνωση της διεισδυτικής ασπεργίλλωσης έχει αξιολογηθεί σε αρκετές μελέτες (Πίνακας 2).^{1,2,13,14} Υπάρχουν δύο δοκιμασίες που ανιχνεύουν τη γαλακτομαννάνη στον ορό των ασθενών. Οι δοκιμασίες αυτές ανιχνεύουν τη γαλακτομαννάνη με το ίδιο μονοκλωνικό αντίσωμα (EBA2) αλλά με διαφορετική μεθοδολογία. Η πρώτη από αυτές ουσιαστικά βασίζεται στην μεθοδολογία της συγκόλλησης σωματιδίων latex (latex agglutination, LA, Pastorex Aspergillus, Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, France), ενώ η δεύτερη στην ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Platelia Aspergillus, BioRad, France). Με τη τελευταία επιτυγχάνεται η ανίχνευση περίπου 1 ng/ml γαλακτομαννάνης, που είναι ποσότητα 10-20 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη που είχε επιτευχθεί με την πρώτη μεθοδολογία. Ο χρόνος που απαιτείται για το αποτέλεσμα της μελέτης υπολογίζεται σε 3 ώρες. Σήμερα η πρώτη μέθοδος ως μη ευαίσθητη έχει

Πίνακας 2. Σύγκριση των νεότερων μεθόδων ανίχνευσης μυκήτων.

	Γαλακτομαννάνη	PCR	Γλυκάνη
Πρώιμη ανίχνευση	+	+	+
Γρήγορο αποτέλεσμα	+	+	+
Ευρύ φάσμα μυκήτων	-	+	+
Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους	-	+	-
Ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος	+	+/-	+
Υψηλό κόστος	+	+	+
Προτυποποίηση της μεθόδου	+	-	+

αντικατασταθεί από τη δεύτερη. Η τιμή αναφοράς για το θετικό αποτέλεσμα της ELISA στο αίμα είναι $>0,5$. Στο υγρό BAL δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, η τιμή όμως 1,0 θεωρείται το όριο θετικότητας.^{2,7,8,13,14}

Με τα δεδομένα που υπάρχουν στους ενήλικους, η δοκιμασία αυτή έχει φανεί σε αρκετές μελέτες να έχει ευαισθησία πάνω από 85% (60-92,6%) και ειδικότητα πάνω από 85%. Στα παιδιά αντίθετα υπάρχουν λίγα δεδομένα. Σε δύο μελέτες που έχουν συμπεριλάβει τόσο ενήλικους, όσο και παιδιά φάνηκε ότι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα ήταν περισσότερα στα παιδιά.^{2,4,15,16}

Αυτά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα αποτελούν και τους κύριους περιορισμούς της εξέτασης. Έχει φανεί ότι η χρήση αντιμικροβιακών και συγκεκριμένα πιπερακιλλίνης/ταζοβακτάμης καθώς και αμοξυκιλλίνης με ή χωρίς κλαβουλανικό οξύ μπορεί να συμβάλουν σε ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται τόσο στους ενήλικους όσο και στα παιδιά. Ειδικά όμως στα νεογνά και τα μικρά παιδιά η δοκιμασία μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα χωρίς να μεσολαβούν άλλοι παράγοντες. Είναι πιθανό ότι ένα συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος βακτηρίων, όπως το *Bifidobacterium bifidum*, που υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση στο έντερο των μικρών παιδιών, έχει τον ίδιο επίτοπο με αυτόν που αναγνωρίζει το μονοκλωνικό αντίσωμα της εξέτασης. Άλλη πιθανή πηγή γαλακτομαννάνης μπορεί να είναι τα βρεφικά γάλατα, τροφές ή ακόμη και το νερό. Εξαιτίας του ανώριμου εντερικού βλενογόννου εισέρχονται στη κυκλοφορία και μπορεί να ανιχνευθούν με τις παραπάνω δοκιμασίες. Εκτός από τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα της μεθόδου, σε παιδιά με ορισμένες κατηγορίες νοσημάτων, όπως χρόνια κοκκιωματώδη νόσο, έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν αρκετά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Σε αυτήν την κατηγορία των ασθενών τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα οφείλονται στο γεγονός ότι σπάνια συμβαίνει καταστροφή και διείσδυση του μύκητα στα αγγεία του ασθενούς.^{2,15,16}

Η ανίχνευση της γαλακτομαννάνης εκτός από τον ορό μπορεί να γίνει και σε άλλα βιολογικά υγρά, μεταξύ των οποίων και στο BAL, για τη διάγνωση της πνευμονικήςaspergίλλωσης. Η ανίχνευσή της σε αυτήν την περίπτωση αναφέρεται από πολλούς ερευνητές ότι πιθανό να είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς η απελευθέρωση της γαλακτομαννάνης από τα στελέχη *Aspergillus* γίνεται κυρίως κατά την ανάπτυξη των υφών και σε πολύ μικρότερο βαθμό από τα κονίδια. Αντίθετα, η ανίχνευση στελεχών *Aspergillus* στο BAL είτε με καλλιέργεια είτε ακόμη και με μεθόδους μοριακής τεχνολογίας (PCR) μπορεί απλά να σημαίνει την ύπαρξη κονιδίων (αποικισμός) στο αναπνευστικό σύστημα.^{2,14}

Άλλα αντιγόνα-συστατικά των μυκήτων που είναι υπό μελέτη για τη χρήση τους στην ανίχνευση των μυκητιάσεων (κυρίως από *Aspergillus* spp, και *Candida* spp) είναι: οι μαννάνες, χιτίνη, ενολάση, heat sock protein (HSP 90), αραβινιτόλη, D μανιτόλη κ.α.¹⁴

Μέθοδοι μοριακής τεχνολογίας

Μεταξύ των μεθόδων μεγέθυνσης των νουκλεϊκών οξέων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση συστηματικών μυκητιάσεων η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) κατέχει το σημαντικότερο ρόλο. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μυκήτων στα περισσότερα κλινικά δείγματα (αίμα, πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, υλικά βιοψίας και εγκεφαλονωτιαίο υγρό) και το όριο ανίχνευσής της φτάνει τα 10 fg DNA που αντιστοιχεί περίπου σε 1 cfu/ml αίματος.¹⁷

Ως γονιδιακοί στόχοι της PCR για τη ανίχνευση των μυκήτων χρησιμοποιούνται κυρίως ακολουθίες ριβοσωμιακού DNA καθώς και μιτοχονδριακά γονίδια. Οι παραπάνω γονιδιακές περιοχές περιλαμβάνουν ακολουθίες που είναι είτε κοινές μεταξύ των μυκήτων (δίνοντας τη δυνατότητα για καλύτερη ευαισθησία της μεθόδου) είτε είναι διαφορετικές ανάλογα

με το είδος του μύκητα (δίνοντας τη δυνατότητα για τυποποίηση του συγκεκριμένου στελέχους).^{2,4,17-19}

Το κύριο μειονέκτημα της PCR είναι ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικά πρωτόκολλα για την εξαγωγή του DNA από τους μύκητες, το σχεδιασμό της διαδικασίας καθώς και τη περαιτέρω μελέτη του αποτελέσματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει κοινά αποδεκτή μεθοδολογία PCR ως τώρα ώστε τα αποτελέσματα να συγκριθούν μεταξύ τους. Επιπλέον, ως πολύ ευαίσθητη, η μέθοδος ενέχει πάντα τον κίνδυνο επιμόλυνσης του δείγματος. Για τους παραπάνω λόγους η PCR δε χρησιμοποιείται ακόμη από την EORTC/MSG στα μικροβιολογικά κριτήρια των διεισδυτικών μυκητιάσεων (Πίνακας 2).^{7,8,17-19}

Παρά τα όποια προβλήματα υπάρχουν στην αξιολόγηση της PCR, αυτή εξακολουθεί να είναι μια από τις μεθόδους που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την πρώιμη διάγνωση μιας μυκητιασικής λοίμωξης, πριν την εγκατάσταση της κλινικής συμπτωματολογίας. Η ευαισθησία της μεθόδου έχει φανεί να κυμαίνεται μεταξύ 75 -100% ενώ η ειδικότητα της 65-98%.¹⁷⁻¹⁹ Σε μια πρόσφατη μεταανάλυση φάνηκε ότι η χρήση μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση του ασπεργίλλου ειδικά για το BAL έχουν πολύ υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία από ότι η καλλιέργεια.²⁰

Υπαρκτό πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι ειδικά στα νεογνά και στα μικρά παιδιά δεν υπάρχουν μελέτες που να παρέχουν δεδομένα πάνω στη διάγνωση μυκητιασικών λοιμώξεων με βάση τη PCR. Η διαπίστωση αυτή γίνεται ακόμη πιο σημαντική εάν ληφθεί υπόψη ότι στην ηλικιακή αυτή ομάδα η προσπάθεια διάγνωσης με την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων (γαλακτομαννάνης και 1,3 β-D γλυκάνης), όπως προ-αναφέρθηκε, είναι δύσκολη εξαιτίας των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.^{4,15,16}

Συμπερασματικά, με τα μέχρι στιγμής δεδομένα ο ρόλος της PCR στη διάγνωση των συστηματικών μυκητιασικών λοιμώξεων συνίσταται στην κατά συχνά διαστήματα εφαρμογή της σε ασθενείς υψηλού κινδύνου σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, όπως για παράδειγμα, ανίχνευση αντιγόνων ή πρώιμων απεικονιστικών ευρημάτων για την επίτευξη πρώιμης διάγνωσης και έγκαιρης έναρξης αντιμυκητιακής αγωγής.^{2,21,22}

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brandt ME, Warnock DW. Laboratory aspects of medical mycology. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, eds. Clinical Mycology. New York: Oxford University Press, Inc; 2003. p. 3-22.
2. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5: 609-622.
3. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 11-19.
4. Roilides E. Early diagnosis of invasive aspergillosis in infants and children. Med Mycol 2006; 44(Suppl): S199-S205.
5. Kaufman L. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. Eur J Epidemiol 1992; 8: 377-382.
6. Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J, Vauras J, Nikoskelainen J, Viljanen MK, et al. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 4304-4311.
7. Ascoglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell

- transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
8. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008, May 5 [Epub ahead of print].
 9. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: i7-i12.
 10. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis* 2003; 37(Suppl): S265-S280.
 11. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
 12. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1 $\rightarrow$ 3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 654-659.
 13. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3922-3925.
 14. Salonen J, Lehtonen OP, Terasjarvi MR, Nikoskelainen J. *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 485-490.
 15. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001; 91:311-318.
 16. Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses* 1998; 41:373-377.
 17. Einsele H, Hebart H, Roller G, Loeffler J, Rothenhofer I, Mueller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1353-1360.
 18. Hebart H, Loeffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Boehme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000; 181: 1713-1719.
 19. Lass-Floerl C, Aigner J, Gonsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, et al. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2001; 113: 180-184.
 20. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 89-94.
 21. Baskova L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1167-1173.
 22. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1504-1512.

Μικροβιολογική διάγνωση φυματίωσης στα παιδιά

Σ. Καναβάκη, Β. Σπυρόπουλος

Έχει υπολογισθεί ότι τα παιδιά αποτελούν το 5-15% του συνολικού αριθμού των κρουσμάτων φυματίωσης σε διεθνές επίπεδο. Όμως, το ποσοστό αυτό κυμαίνεται σε αρκετά μεγαλύτερα επίπεδα στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ οι συνεχείς μεταβολές στην επιδημιολογία της νόσου αναδεικνύουν τον κίνδυνο αύξησης του αριθμού των κρουσμάτων μεταξύ των παιδιών γενικότερα.¹⁻³

ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σε πολλές περιπτώσεις, η διάγνωση της παιδικής φυματίωσης πραγματοποιείται χωρίς να προηγηθεί μικροβιολογικός έλεγχος. Παρόλα αυτά, η μικροβιολογική επιβεβαίωση είναι πολύτιμη, διότι, ενισχύει αποφασιστικά την κλινική διάγνωση.

Οι οδοί της μικροβιολογικής διάγνωσης είναι δύο, η κλασσική και η σύγχρονη, έχοντας και οι δύο ως κοινούς στόχους την αναζήτηση του βακίλου στο δείγμα, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους και τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στα αντιφυματικά φάρμακα.

Η κλασσική μεθοδολογία περιλαμβάνει, όπως είναι γνωστό, τη *μικροσκοπική εξέταση*, την *καλλιέργεια* σε στερεό ή υγρό υλικό για την απομόνωση του βακίλου, την *ταυτοποίηση* σε επίπεδο είδους για λόγους κλινικούς, επιδημιολογικούς και θεραπευτικούς, και τέλος, τον *έλεγχο ευαισθησίας* στα αντιφυματικά φάρμακα. Σημειώνεται ότι, με τις κλασσικές μεθόδους η ταυτοποίηση πραγματοποιείται με τη μελέτη των βιοχημικών και καλλιεργητικών χαρακτήρων του βακίλου. Ο έλεγχος της ευαισθησίας, εξάλλου, στηρίζεται στο κριτήριο της αναλογίας της ανάπτυξης στελεχών σε θρεπτικό υλικό με συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου, συγκριτικά με την ανάπτυξη σε υλικό χωρίς φάρμακο. Εάν ο αριθμός των αποικιών στο υλικό με φάρμακο αντιστοιχεί σε ποσοστό $>1\%$ συγκριτικά με τον αριθμό των αποικιών στο υλικό χωρίς φάρμακο, τότε το στέλεχος θεωρείται ανθεκτικό.

Η σύγχρονη διάγνωση βασίζεται σε μοριακές μεθόδους και έχει, όπως αναφέρθηκε, ανάλογες επιδιώξεις με την κλασσική, δηλαδή την *ανίχνευση* του βακίλου στο δείγμα με εντόπιση ειδικών αλληλουχιών (ταυτότητα του μικροβίου), την *ταυτοποίηση* σε επίπεδο είδους, με ανίχνευση συγκεκριμένων για το είδος αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και τέλος, τη *διάγνωση της ανθεκτικότητας*. Ειδικότερα, ο μοριακός έλεγχος ανθεκτικότητας αφορά κυρίως στα δύο σημαντικότερα πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα, την Ισονιαζίδη (INH) και τη Ριφαμπικίνη (RIF), παρέχοντας ταυτόχρονα και τη δυνατότητα άμεσου ελέγχου της πολυανθεκτικότητας (INH+RIF). Αυτό επιτυγχάνεται με την ανίχνευση των συχνότερων με-

ταλλάξεων στα γονίδια katG (katG315) και inhA που είναι υπεύθυνες για την αντοχή στην INH, καθώς και των μεταλλάξεων στο rpoB γονίδιο που ευθύνονται για την αντοχή στη RIF.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η ποιότητα των κλινικών δειγμάτων αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για την επιτυχία της μικροβιολογικής διάγνωσης. Η επιτυχία του μικροβιολογικού ελέγχου βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με την ποιότητα του δείγματος και τη συγκέντρωση των βακίλων στο δείγμα.

Πτύελα

Τα πτύελα αποτελούν σύνηθες δείγμα στην περίπτωση ενηλίκων ασθενών, όμως παρέχουν εξαιρετικά περιορισμένες δυνατότητες θετικού αποτελέσματος στα παιδιά, δεδομένης της σπανιότητας της δευτερογενούς βλάβης και επομένως της απόχρεμψης. Όμως, και στην περίπτωση που παράγουν πτύελα, η συγκέντρωση των βακίλων είναι πολύ μικρότερη από ότι στους ενήλικους ασθενείς.^{1,4}

Γαστρικό υγρό

Το γαστρικό υγρό που λαμβάνεται νωρίς το πρωί με το ξύπνημα του παιδιού και πριν τη λήψη οποιασδήποτε τροφής θεωρείται δείγμα ιδιαίτερα καλής ποιότητας. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η άμεση εξουδετέρωση του pH, ώστε να διατηρηθεί η βιωσιμότητα των βακίλων. Αυτό επιτυγχάνεται με διάλυμα NaHCO_3 των 100 mg/ml (3 ml NaHCO_3 σε όγκο 10 ml γαστρικού υγρού) με αναπροσαρμογή των αναλογιών με βάση τον όγκο του συλλεγέντος δείγματος. Παρά το γεγονός ότι το γαστρικό υγρό υπερέχει σε καταλληλότητα, η πιθανότητα για θετικό καλλιεργητικό αποτέλεσμα κυμαίνεται στο 33-50%, με την προϋπόθεση να εξεταστούν τρία (3) διαδοχικά πρωινά δείγματα.^{1,4}

Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

Αν και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) θεωρητικά αποτελεί δείγμα υψηλής ποιότητας, η καθ' ημέραν πράξη αποδεικνύει ότι είναι κατώτερο σε σύγκριση με το γαστρικό υγρό, υπό τις προϋποθέσεις λήψης που ήδη περιγράφηκαν. Ωστόσο, ο ταυτόχρονος έλεγχος στον ίδιο ασθενή γαστρικού υγρού και BAL αυξάνει περαιτέρω τις διαγνωστικές πιθανότητες.^{1,4}

Πλευριτικό υγρό

Το πλευριτικό υγρό είναι ενδεικτικό φυματιώδους εξιδρώματος, όταν η πρωτεΐνη είναι 20-40 g/L, με αρκετές χιλιάδες λευκοκύτταρα/mm³ και πολυμορφοπυρηνικό τύπο κυττάρων, που μεταπίπτει αργότερα σε λεμφοκυτταρικό. Το μικροσκοπικό αποτέλεσμα είναι σπανίως θετικό (<10%), ενώ η καλλιέργεια είναι θετική στο 20-30% των περιπτώσεων.¹

Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Σε περιπτώσεις φυματιώδους μηνιγγίτιδας το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) παρουσιάζει αριθμό κυττάρων 10-500 /mm³ και γλυκόζη χαμηλή $\leq 2,2$ mmol/L. Οι πιθανότητες θετικού μικροσκοπικού αποτελέσματος είναι 1,7%, θετικής καλλιέργειας 34,5%, ενώ η ανίχνευση του βακίλου στο δείγμα με μοριακή μέθοδο αποδεικνύεται επιτυχής στο 13,8% των περιπτώσεων. Η απαιτούμενη ποσότητα ENY είναι τουλάχιστον 2 ml. Αν αυτή είναι μικρότερη συνιστάται άμεσος εμβολισμός σε φιαλίδια περιέχοντα θρεπτικό ζωμό (φιάλες αιμοκαλλιεργείων).¹

Δείγμα ιστού ή πύου από ύποπτες περιοχές

Θεωρείται δείγμα καλής ποιότητας. Απαιτείται ποσότητα περίπου 1 g, που λαμβάνεται κάτω από άσηπτες συνθήκες, σε στείρο δοχείο, χωρίς συντηρητικά ή φυσιολογικό ορό. Σε περίπτωση δερματικής βλάβης η συλλογή γίνεται από την περίμετρο της βλάβης.¹

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κλασικές μέθοδοι

Μικροσκοπική εξέταση

Η μικροσκοπική εξέταση διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην αντιμετώπιση της φυματίωσης, διότι το θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνει χωρίς καθυστέρηση τη διάγνωση και παρέχει τη δυνατότητα άμεσης έναρξης θεραπείας και κινητοποίησης για τον εντοπισμό των ενηλίκων που μεταδίδουν τη νόσο. Για την εξασφάλιση θετικού μικροσκοπικού αποτελέσματος απαιτούνται τουλάχιστον 10^3 - 10^4 βάκιλοι/ml δείγματος. Η πιθανότητα θετικού μικροσκοπικού αποτελέσματος είναι ανάλογη του αριθμού των βακίλων στο δείγμα. Κυμαίνεται από 10%, εάν ο αριθμός τους είναι 10^3 /ml, έως 99-100%, εάν αυτός είναι 5×10^5 /ml δείγματος. Κατά κανόνα, τα βιολογικά υγρά παρέχουν μικρότερες πιθανότητες θετικού αποτελέσματος, εξαιτίας της μικρότερης συγκέντρωσης βακίλων.⁵

Για τη μικροσκόπηση εφαρμόζονται οξεάντοχες χρώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τις χρωστικές φαινοϋχίου φουζίνης (Ziehl-Neelsen ή Kinyoun) και τις χρωστικές φθοριοχρώματος (auramine 0 και auramine rhodamine). Με τις πρώτες, τα μυκοβακτηρίδια χρωματίζονται κόκκινα σε μπλε φόντο, ενώ απαιτείται να εξετάζονται τουλάχιστον 100 μικροσκοπικά πεδία, με φακό $\times 100$. Με τις δεύτερες, δηλαδή τις χρωστικές φθοριοχρώματος, τα μυκοβακτηρίδια χρωματίζονται κίτρινα, φθορίζοντας σε κόκκινο φόντο, ενώ η μικροσκόπηση γίνεται με φακό $\times 40$ με εξέταση τουλάχιστον 30 οπτικών πεδίων. Η φθορίζουσα χρώση διαθέτει μεγαλύτερη ευαισθησία, διότι ελέγχεται μεγαλύτερη περιοχή του παρασκευάσματος. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ακολουθεί απαραίτητα επιβεβαίωση με Ziehl-Neelsen.⁵

Αξίζει να σημειωθεί ότι η θετική μικροσκοπική εξέταση επιβεβαιώνει την κλινική εικόνα, ενώ η αρνητική δεν αποκλείει τη νόσο. Η ευαισθησία του μικροσκοπικού ελέγχου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ειδική εμπειρία του μικροβιολόγου, καθώς και από την επάρκεια της ποσότητας και της ποιότητας του δείγματος. Πέραν της χαμηλής ευαισθησίας, πρόσθετο μειονέκτημα της μικροσκοπικής εξέτασης αποτελεί και η αδυναμία διαχωρισμού στελεχών *M. tuberculosis* (MTB) από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια (Non Tuberculous Mycobacteria – NTM).⁵

Πρέπει να σημειωθεί ότι, σε περίπτωση θετικού μικροσκοπικού ή καλλιεργητικού αποτελέσματος πρέπει να ενημερώνεται άμεσα η Επιτροπή Ενδονοσοκομειακών Λοιμώξεων του Νοσοκομείου και αυτή με τη σειρά της να ενημερώνει το Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων (ΚΕΕΛΠΝΟ), ώστε να διενεργείται σχολαστική επιδημιολογική διερεύνηση.^{1,4}

Καλλιέργεια

Το θετικό καλλιεργητικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνει απόλυτα την κλινική διάγνωση. Για το σκοπό αυτό, προηγείται ειδική επεξεργασία του δείγματος, που περιλαμβάνει ρευστοποίηση για λύση της βλέννης, εάν υπάρχει, ομογενοποίηση για ίση κατανομή των βακίλων στο δείγμα, απομόλυνση για απαλλαγή του δείγματος από άλλα πιθανά μικρόβια και τέλος,

προσπάθεια αύξησης της συγκέντρωσης των βακίλων, σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο, με φυγοκέντρωση.¹

Μέθοδος αναφοράς (gold standard) θεωρείται η καλλιέργεια σε στερεό υλικό Löwenstein Jensen (LJ). Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου αγγίζουν το 100%. Θετικοποίηση της καλλιέργειας αναμένεται την 5^η-6^η εβδομάδα. Τις 7 πρώτες ημέρες όμως, το εμβολιασμένο δείγμα ελέγχεται καθημερινά, για πιθανή ταχεία ανάπτυξη NTM. Η μορφολογία των αποικιών είναι χαρακτηριστική. Προκειμένου για το MTB, οι αποικίες έχουν εικόνα ξηρά, ρυτιδώδη, συρρέουσα, εύθραυστη και είναι λευκού ή υποκίτρινου χρώματος.^{1,6}

Το αποτέλεσμα της καλλιέργειας εκφράζεται σε συνάρτηση με τον αριθμό των αποικιών. Έτσι, για αριθμό αποικιών 1-50 αναφέρεται απλά ο αριθμός. Εάν ο αριθμός είναι 50-100, το αποτέλεσμα της καλλιέργειας αναφέρεται ως ανάπτυξη 1, εάν είναι 100-200 ως ανάπτυξη 2, 200-500 ως ανάπτυξη 3 και εάν οι αποικίες είναι >500 ως ανάπτυξη 4 (συρρέουσα).⁵

Παρά τη σημαντική αξία της καλλιέργειας, ο μεγάλος χρόνος που απαιτεί η θετικοποίησή της αποτελεί βασικό μειονέκτημα. Για την άρση του προβλήματος, η τεχνολογία οδηγήθηκε στη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων υγρής καλλιέργειας με κύριους αντιπροσώπους το ημιαυτοματοποιημένο σύστημα Bactec 460 και το μετεξελιγμένο, νεότερης γενιάς, πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα Bactec MGIT 960. Η εταιρεία Becton Dickinson αντιπροσωπεύει και τα δύο.⁵

Ειδικότερα, το σύστημα Bactec 460 απαιτεί τη χρησιμοποίηση φιαλιδίων με υγρό θρεπτικό υλικό Middlebrook 7^H12, τα οποία περιέχουν υπόστρωμα ειδικό για την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου. Το υπόστρωμα είναι σεσημασμένο με ¹⁴C. Ο μεταβολισμός του υποστρώματος από τους αναπτυσσόμενους βακίλους οδηγεί σε απελευθέρωση ¹⁴CO₂ που μετράται από το σύστημα. Η ένδειξη είναι ανάλογη του αριθμού των βακίλων. Το θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται με μικροσκοπική εξέταση και ανακαλλιέργεια σε στερεό LJ. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η συντόμευση του χρόνου ανάπτυξης σε <7 ημέρες για τα NTM και σε 9-14 για το MTB. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι οι αυξημένες επιμολύνσεις, η αδυναμία επισκόπησης των αποικιών, η χρήση ραδιενεργών ουσιών και το υψηλό σχετικά κόστος.⁵

Το νεότερο σύστημα Bactec MGIT 960 απαιτεί φιαλίδια με υγρό θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H9, τα οποία φέρουν στον πυθμένα σιλικόνη εμπλουτισμένη με άλας ρουθενίου. Η ουσία αυτή φθορίζει σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου που δημιουργούνται από την κατανάλωσή του από τα αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια. Ο φθορισμός μετράται αυτόματα ανά ώρα. Το δείγμα θεωρείται αρνητικό μετά από 42 ημέρες, ενώ ο μέσος χρόνος ανάπτυξης είναι 14 ημέρες. Το σύστημα Bactec MGIT έχει ευαισθησία 60-90% σε σύγκριση με τη κλασσική καλλιέργεια, πλεονεκτεί δε έναντι του συστήματος Bactec460 στο ότι, δεν απαιτεί ραδιενεργές ουσίες. Για λόγους σύγκρισης, αξίζει να αναφερθεί ότι, ο χρόνος ανάπτυξης είναι 24,1 ημέρες με την κλασσική μέθοδο, 15,2 με το σύστημα Bactec 460 και 14,2 με το σύστημα Bactec MGIT 960. Η συμφωνία των δύο συστημάτων Bactec είναι >96%.^{1,4,6}

Τα συστήματα Bactec δεν έχουν αξιολογηθεί διεξοδικά στην περίπτωση της παιδικής φυματίωσης. Αδιαμφισβήτητα όμως, είναι εξαιρετικά χρήσιμα διότι συντομεύουν πολύ το χρόνο ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων. Αποτελούν ευαίσθητη μέθοδο καλλιέργειας τόσο για το MTB όσο και για τα NTM. Το οικονομικό κόστος από την εφαρμογή των αυτοματοποιημένων συστημάτων καλλιέργειας, αν και δεν είναι υπερβολικό, είναι υπολογίσιμο.⁵ Το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων θεωρεί ότι η καλλιέργεια με το σύστημα Bactec MGIT είναι χρήσιμη και πρέπει να εφαρμόζεται σε όλες τις περιπτώσεις παιδικής φυματίωσης.

Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο είδους είναι απαραίτητη τόσο για λόγους επιδημιολογικούς, όσο και για λόγους θεραπευτικούς.

Η ταυτοποίηση είναι σύνθετη διεργασία και απαιτεί ειδική εμπειρία. Γι' αυτό, πρέπει να γίνεται μόνο από ειδικά εργαστήρια, με μόνη εξαίρεση το MTB, για το οποίο τα μεγάλα Νοσοκομεία μπορούν να διεξάγουν μία προκαταρκτική ταυτοποίηση.⁵

Η ταυτοποίηση με την κλασική οδό περιλαμβάνει τη μελέτη των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών των βακίλων, των καλλιεργητικών τους χαρακτηριστικών και κυρίως, την ταχύτητα και θερμοκρασία ανάπτυξης, καθώς και τη μορφή και χρώμα των αποικιών στο φως και στο σκοτάδι. Επίσης, περιλαμβάνει μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών του μυκοβακτηριδίου, όπως, παραγωγή καταλάσης, παραγωγή νιασίνης, αναγωγή νιτρικών και παραγωγή πυραζιναμιδάσης. Ακολουθεί η μοριακή ταυτοποίηση, στην οποία κατά κανόνα βασίζεται η ταυτοποίηση του στελέχους.⁶

Ευαισθησία

Η ανθεκτικότητα των μυκοβακτηριδίων ακολουθεί τους νόμους της αυτόματης μετάλλαξης. Φαίνεται ότι, κάθε πληθυσμός MTB περιλαμβάνει, εξ αρχής, ένα μικρό αριθμό ανθεκτικών στελεχών. Υπολογίζεται ότι, προκειμένου για την INH αντιστοιχεί ένας ανθεκτικός βάκιλος σε πληθυσμό βακίλων 10^5 , για τη στρεπτομυκίνη (STM) ένας βάκιλος σε πληθυσμό 10^6 και για τη RIF, ένας βάκιλος σε πληθυσμό 10^7 . Η αντοχή αυτή είναι ενδογενής, δηλαδή, ο συγκεκριμένος βάκιλος είναι ανθεκτικός σε ένα φάρμακο, χωρίς να έχει έρθει προηγούμενα σε επαφή με το φάρμακο αυτό. Η αντοχή αυτή ονομάζεται αντοχή αγρίου τύπου.⁵

Έτσι ένα σπλήαιο φυματικού ασθενούς που θεωρητικά περιέχει 10^7 - 10^9 MTB, περιλαμβάνει ανάμεσά τους σημαντικό αριθμό ανθεκτικών στελεχών. Εξαιτίας αυτού, και προκειμένου να αποφευχθεί η τελική επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών, τα θεραπευτικά σχήματα πρέπει να αποτελούνται από περισσότερα του ενός φάρμακα, στα οποία να είναι ευαίσθητο το MTB. Αν και ο έλεγχος ευαισθησίας δεν είναι κατ' αρχήν απαραίτητος για την έναρξη αντι-TB αγωγής, αυτός δεν πρέπει ποτέ να παραλείπεται, ώστε να επιβεβαιώνεται η ορθότητα του αρχικά επιλεγέντος σχήματος.⁵

Ο έλεγχος ευαισθησίας πρέπει να επαναλαμβάνεται στις περιπτώσεις, όπου, ο ασθενής εμφανίζει θετική καλλιέργεια 3 μήνες μετά την έναρξη της αγωγής.

Τα αντιφυματικά φάρμακα διακρίνονται σε πρώτης και δεύτερης γραμμής. Η πρώτη γραμμή περιλαμβάνει τη STM, την INH, τη RIF, την εθαμβουτόλη και την πυραζιναμίδη (PZA), ενώ η δεύτερη γραμμή, την εθειοναμίδη, το παρα-αμινο-σαλικυλικό οξύ (PAS), την κυκλοσερίνη, την καπρεομυκίνη, τη σιπροφλοξασίνη και τη ριφαμπουτίνη, καθώς και την αμικασίνη, μοξυφλοξασίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη και ιμιπενέμη. Τα φάρμακα δεύτερης γραμμής είναι συνήθως τοξικότερα και γι' αυτό χορηγούνται με προσοχή, σε περιπτώσεις αποτυχίας ή ανάπτυξης τοξικότητας σε εκείνα της πρώτης.⁵

Ανθεκτικό θεωρείται το στέλεχος, με αντοχή σε ένα από τα πρώτης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα, πολυανθεκτικό (Multi Drug Resistant-MDR) το στέλεχος με αντοχή τουλάχιστον στην INH και RIF και τέλος υπερανθεκτικό (Extensively Drug Resistant – XDR), το ανθεκτικό στην INH, RIF και κινολόνες, καθώς και σε ένα από τα δεύτερης γραμμής ενέσιμα φάρμακα (αμικασίνη, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη).^{6,7}

Μοριακές μέθοδοι

Οι μοριακές μέθοδοι άρχισαν να εφαρμόζονται για τη μικροβιολογική διάγνωση της φυματίωσης, ήδη από το 1987, με στόχο πάντα όπως αναφέρθηκε, την έγκαιρη διάγνωση και έναρξη θεραπείας. Οι μοριακές μέθοδοι περιορίζουν το χρόνο διάγνωσης σε ώρες ή λίγες ημέρες, αντί εβδομάδες που χρειάζονται οι κλασικές, ενώ απαιτείται ελάχιστος αριθμός βακίλων για τη θετικοποίηση του αποτελέσματος. Θεωρητικά, απαιτούνται 10^4 /ml βάκιλοι για θετική μικροσκοπική, 10^2 - 10^3 /ml για θετική καλλιέργεια και μόνο 1 βάκιλος/ml για θετικό αποτέλεσμα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).^{1,4}

Όπως αναφέρθηκε, βασική αρχή κάθε μοριακής τεχνικής είναι η ανίχνευση ειδικής αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με υβριδισμό με μια συμπληρωματική αλληλουχία (probe), οπότε, τελικά, ανιχνεύεται το υβρίδιο.

Οι μοριακές μέθοδοι αναπτύχθηκαν με ταχείς ρυθμούς. Αν και απαιτείται ειδική εμπειρία, σήμερα είναι ευκολότερα εφαρμόσιμες διότι αρκετές από αυτές προσφέρονται υπό τη μορφή εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων. Ωστόσο, οι μοριακές μέθοδοι δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τις κλασικές, αλλά πρέπει πάντα να εφαρμόζονται παράλληλα με αυτές και να αξιολογούνται σε συνάρτηση με τη κλινική εικόνα του ασθενούς.⁵

Η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών είναι ιδιαίτερα ελκυστική διότι, εκτός της συντόμευσης του χρόνου μικροβιολογικής διάγνωσης, διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Ωστόσο, στην πράξη η ευαισθησία των μεθόδων αυτών έχει αποδειχθεί μικρότερη της θεωρητικής. Έτσι, για δείγματα με θετική μικροσκοπική εξέταση, η ευαισθησία κυμαίνεται στο 80-100%, ενώ για δείγματα με αρνητική μικροσκοπική και θετικό καλλιεργητικό αποτέλεσμα στο 50-95%.⁵ Οι μοριακές τεχνικές διαθέτουν μεν το πλεονέκτημα του άμεσου αποτελέσματος, μειονεκτούν όμως, στο ότι δεν παρέχουν τη δυνατότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού. Επίσης, απαιτούν ειδική εμπειρία, ειδικό εξοπλισμό και έχουν υψηλό κόστος. Γι' αυτό και δεν πρέπει να γίνεται κατάχρηση στην εφαρμογή τους. Αξίζει πάντως να σημειωθεί, ότι επί του παρόντος, οι μοριακές τεχνικές δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς στα παιδιά.^{1,4}

Άμεση ανίχνευση βακίλων στο δείγμα

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος είναι η PCR, η οποία χρησιμοποιεί εκκινητές (primers) για να επιτύχει θερμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου με επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης, σύνδεσης με τους εκκινητές, και επιμήκυνσης. Υπολογίζεται ότι η ευαισθησία της PCR συγκριτικά με την κλινική διάγνωση στα παιδιά, κυμαίνεται στο 40-60% και η ειδικότητα στο 80-96%. Επίσης, υπολογίζεται ότι 39% των παιδιών με αρνητικά ακτινολογικά ευρήματα ή κλινικές ενδείξεις έχουν PCR θετική. Πάντως, η PCR μόνη της δεν θεωρείται αρκετή για τη διάγνωση της παιδικής φυματίωσης.⁵

Στη μέθοδο PCR βασίζεται το σύστημα Amplicor MTB® (Roche Diagnostics), καθώς και το αυτοματοποιημένο σύστημα Cobas Amplicor MTB System® της ίδιας εταιρείας. Η μέθοδος έχει στόχο το 16S rRNA του *M. tuberculosis*. Είναι αναγνωρισμένη από τον οργανισμό FDA των ΗΠΑ, για την ανίχνευσή του σε δείγματα από το αναπνευστικό με θετική μικροσκοπική και σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει αγωγή ή αυτή δεν έχει χορηγηθεί για περισσότερο από 7 ημέρες. Στους ενήλικους, η ευαισθησία της μεθόδου συγκριτικά με τη καλλιέργεια, σε περιπτώσεις ασθενών με θετική μικροσκοπική, υπολογίζεται στο 90%, ενώ η ειδικότητα στο 95%. Αντίθετα, σε ασθενείς με αρνητική μικροσκοπική η ευαισθησία είναι περίπου 50%.⁵

Εκτός από την Amplicor Cobas PCR, ο οργανισμός FDA έχει επίσης εγκρίνει, υπό τις ίδιες

με τις ανωτέρω προϋποθέσεις, την τεχνική Amplified Mycobacterium Direct Test (AMTD)[®] της εταιρείας Gen Probe.⁶ Η μέθοδος AMTD, όμως, σε αντίθεση με τη Cobas Amplicor, μπορεί να εφαρμόζεται και σε δείγματα από το αναπνευστικό με αρνητική μικροσκοπική εξέταση. Η μέθοδος AMTD έχει, συγκριτικά με τη καλλιέργεια, ευαισθησία 60-90% και ειδικότητα 98-100% σε ενήλικους. Η τεχνική AMTD βασίζεται στη μοριακή μέθοδο Transcription Mediated Amplification - TMA, η οποία έχει στόχο το 16S rRNA του μυκοβακτηριδίου, απαιτεί δε ισοθερμικό πολλαπλασιασμό και όχι θερμοκυκλοποιητή. Η μέθοδος ολοκληρώνεται σε ένα μόνο σωληνάριο και έχει ικανότητα ανίχνευσης $<10^3$ αντιγράφων rRNA, ποσότητας που ισοδυναμεί με ένα μυκοβακτηρίδιο σε δείγματα χωρίς χλωρίδα και σε 5, σε δείγματα με χλωρίδα.⁵

Επίσης, σύγχρονη και ευρέως εφαρμοζόμενη πλέον τεχνική είναι η GenoType Mycobacteria Direct[®] (Hain LifeScience) η οποία είναι μοριακή μέθοδος συνδυασμού ανάστροφου υβριδισμού και ανιχνευτών γραμμικής διάταξης. Η μέθοδος συνιστάται και αυτή για έλεγχο δειγμάτων αναπνευστικού. Επιτρέπει την άμεση και σύγχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση των *M. tuberculosis complex* και των *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. malmoensae* και *M. kansasii* σε κλινικά δείγματα.

Άλλη αξιολογη μέθοδος είναι η Strand Displacement Amplification-SDA[®], η οποία είναι ισοθερμική αντίδραση πολλαπλασιασμού του DNA και εφαρμόζεται στο σύστημα ProbeTec[®] της εταιρείας Becton-Dickinson. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί η μέθοδος Q-Beta replicase[®], η οποία χρησιμοποιεί ως στόχο το 23S rRNA του *M. tuberculosis*.⁵

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του μοριακού ελέγχου για την άμεση ανίχνευση του βακίλου στο δείγμα πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος τόσο του μικροσκοπικού, όσο και του μοριακού ελέγχου, οι πιθανότητα λοίμωξης από MTB είναι εξαιρετικά υψηλή. Σε περίπτωση θετικού μικροσκοπικού αποτελέσματος και αρνητικού μοριακού ελέγχου, τίθενται βάσιμες υποψίες λοίμωξης από NTM βακίλους. Σε περίπτωση αρνητικού μικροσκοπικού αποτελέσματος και θετικού μοριακού ελέγχου, τίθεται η υποψία MTB, αλλά χρειάζεται άμεση επανάληψη σε νέο δείγμα. Τέλος, σε περίπτωση αρνητικού μικροσκοπικού αποτελέσματος και αρνητικού μοριακού ελέγχου, η λοίμωξη δεν μπορεί να αποκλεισθεί με βεβαιότητα. Εάν υπάρχουν υποψίες, ο έλεγχος πρέπει να επαναληφθεί σε νέα δείγματα.⁵

Συνοψίζοντας, οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης βακίλων στο δείγμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις αρνητικού μικροσκοπικού αποτελέσματος. Επίσης, μπορούν να διευκρινίσουν άμεσα εάν ο βάκιλος είναι πράγματι MTB. Είναι χρήσιμες εκεί όπου η διάγνωση είναι δύσκολη καθώς και στις περιπτώσεις διερεύνησης ανοσοκατεσταλμένων παιδιών. Η καλλιέργεια αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς, πρέπει να εφαρμόζεται σε όλες τις περιπτώσεις και είναι εκείνη που επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα.^{1,4,7}

Ταυτοποίηση

Πέραν της αναζήτησης του MTB με ανίχνευση στο δείγμα, ο μοριακός έλεγχος, όπως αναφέρθηκε, επεκτείνεται και στην ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο είδους.

Η μοριακή ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων περιλαμβάνει σειρά τεχνικών, οι οποίες βασίζονται σε ποικιλία μεθόδων.⁵ Εμπορικά διαθέσιμες είναι οι ακόλουθες.

- α) Η τεχνική Accuprobe-Mycobacteria Culture Identification test[®] (Gene Probe, Biomérieux). Η μέθοδος χρησιμοποιεί DNA ανιχνευτές (probes) και βασίζεται στην αρχή του υβριδισμού από καλλιέργημα. Η εφαρμογή της ολοκληρώνεται σε 30 min. Ταυτοποιεί τα βακτήρια *M. tuberculosis complex*, *M. avium complex*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* και *M. kansasii*.

- β) Η Inno-Lipa Mycobacteria® (Innogenetics) είναι συνδυασμός μεθόδων ανάστροφου υβριδισμού και ανιχνευτών γραμμικής διάταξης. Ανιχνεύει το MTB complex στο σύνολο του, καθώς και τα *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. goodii*, *M. genovense*, *M. simiae*, *M. mageritense*, *M. abscessus*, MAIS complex (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*), *M. avium sbs paratuberculosis*, *M. silvaticum*, *M. chelonae* και *M. fortuitum*.
- γ) Οι μέθοδοι Genotype Mycobacterium® CM (Common species) και AS (additional species), Hain LifeScience, βασίζονται επίσης σε συνδυασμό ανάστροφου υβριδισμού και ανιχνευτών γραμμικής διάταξης. Ανιχνεύουν συχνά 13 και σπανιότερα 16 NTM.
- δ) Η Genotype MTBC® (Hain LifeScience) επίσης αποτελεί μέθοδο συνδυασμού ανάστροφου υβριδισμού και γραμμικής διάταξης, η οποία ανιχνεύει και ταυτοποιεί συγχρόνως τα 6 μυκοβακτηρίδια του MTB complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* BCG και *M. bovis ssp caprae*)
- Μέθοδος αναφοράς θεωρείται η απευθείας ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (sequencing). Απαιτείται εξειδικευμένο εξοπλισμό και ιδιαίτερη εμπειρία, επομένως η εφαρμογή της είναι δυνατή μόνο σε περιορισμένο αριθμό εργαστηρίων.

Έλεγχος ανθεκτικότητας

Η μοριακή διάγνωση της ανθεκτικότητας αφορά κυρίως στην ανίχνευση των υπεύθυνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *rpoB* που κωδικοποιεί την β-υποομάδα της RNA-πολυμεράσης και στο γονίδιο *Kat-G* που κωδικοποιεί την καταλάση-υπεροξειδάση.⁵ Οι τεχνικές που εφαρμόζονται συχνότερα παρατίθενται στη συνέχεια.

- α) InnoLipaRif TB® (Innogenetics) η οποία βασίζεται σε συνδυασμό της μεθόδου του ανάστροφου υβριδισμού και των ανιχνευτών γραμμικής διάταξης για τις συχνότερες μεταλλάξεις στο *rpoB* γονίδιο στις θέσεις 512-513, 514-517, 517-518, 525, 526 και 531 για την ανθεκτικότητα στη RIF αποκλειστικά.
- β) Genotype MTBR plus® (HainLifeScience) μέθοδος συνδυασμού ανάστροφου υβριδισμού και ανιχνευτών γραμμικής διάταξης. Η μέθοδος διαγιγνώσκει ανθεκτικότητα στη RIF, ανιχνεύοντας τις συχνότερες μεταλλάξεις στο *rpoB* γονίδιο στις θέσεις 516, 526 και 531 και την ανθεκτικότητα στην INH, ανιχνεύοντας τις συχνότερες μεταλλάξεις στα γονίδια *kat-G*, *inhA* και *ahpC*, στην περιοχή που αντιστοιχεί στα κωδικόνια 505-533.

Ο μοριακός έλεγχος ανθεκτικότητας είναι εξαιρετικά χρήσιμος διότι παρέχει ταχεία πληροφόρηση, επιτρέποντας την άμεση έναρξη σωστής θεραπείας. Είναι επίσης εξαιρετικά χρήσιμος διότι το θετικό μοριακό αποτέλεσμα ελέγχου άμεσα στο δείγμα ενισχύει τη διάγνωση MTB λοίμωξης. Επίσης ο μοριακός έλεγχος συμβάλλει σημαντικά στην ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο είδους, γεγονός με ιδιαίτερη σημασία επιδημιολογική και θεραπευτική, όπως ήδη αναφέρθηκε.

Συμπερασματικά, η διάθεση κατάλληλου δείγματος σε ικανοποιητική ποσότητα, οι επαναλαμβανόμενες προσπάθειες σε πολλαπλά δείγματα και η παράλληλη εφαρμογή κλασικών και σύγχρονων μεθόδων ενισχύουν τις πιθανότητες μικροβιολογικής τεκμηρίωσης της παιδικής φυματίωσης. Επισημαίνεται πάντως, ότι πολλές από τις σύγχρονες μικροβιολογικές μεθόδους δεν έχουν πλήρως αξιολογηθεί στα παιδιά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gray JW. Childhood tuberculosis and its early diagnosis. *Clin Biochem* 2004; 37: 450-455.
2. Walls T, Shingadia D. Global epidemiology of paediatric tuberculosis. *J Infect* 2004; 48: 13-22.
3. Mayor VR Ramanathan Road. Tuberculosis in HIV-infected children. *Paediatr Respir Rev* 2004; 225-230.
4. Kabra SK, Lodha R, Seth V. Some current concepts on childhood tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 387-397.
5. Pfyffer EG. Mycobacterium: General characteristics, Laboratory Detection and Staining Procedures. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition. Washington DC: American Society of Microbiology press; 2007. p. 543-588.
6. Metchock B, Nolte F, Wallace R. Mycobacterium, In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition. Washington DC: American Society of Microbiology press; 1999. p. 399-437.
7. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 624-632.

Νεότερες ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι στη διάγνωση της φυματίωσης

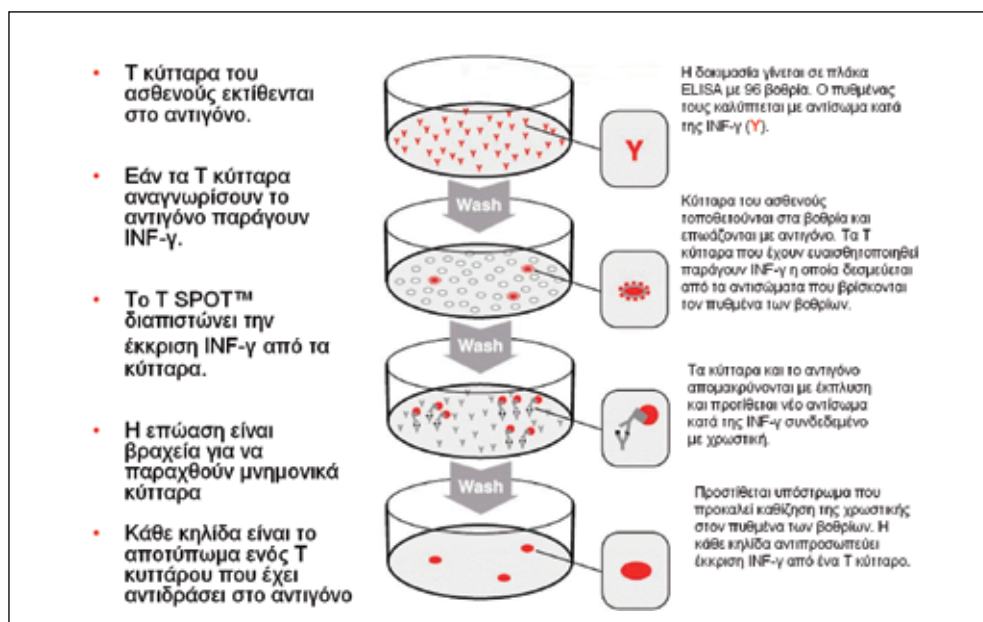
Μ. Τσολιά

Η δερμοαντίδραση Mantoux (φυματινοαντίδραση) έχει χρησιμοποιηθεί επί περισσότερα από 100 χρόνια για τη διάγνωση της λοίμωξης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Ωστόσο, η φυματινοαντίδραση χρησιμοποιεί ένα μίγμα αντιγόνων του *Mycobacterium tuberculosis* και επομένως μπορεί να δώσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα σε άτομα που έχουν εμβολιασθεί με το BCG ή έχουν εκτεθεί σε άτυπα μυκοβακτηρίδια του περιβάλλοντος που μοιράζονται ίδια αντιγόνα. Μπορεί επίσης να δώσει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα σε άτομα που πάσχουν από βαριά φυματίωση ή άλλη σοβαρή νόσο ή έχουν ανοσοανεπάρκεια ή ανοσοκαταστολή. Η επανάληψη της φυματινοαντίδρασης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της απάντησης (boosting). Πρόσθετα, αρκετά συχνά γίνονται λάθη κατά την εφαρμογή ή την εκτίμηση της εάν το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό δεν έχει την κατάλληλη εκπαίδευση και εμπειρία. Τέλος, για να εκτιμηθεί το αποτέλεσμα της φυματινοαντίδρασης απαιτείται και δεύτερη επίσκεψη του ασθενούς στο γιατρό.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ- γ

Με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών, η σύγχρονη έρευνα κατευθύνθηκε προς τη ανίχνευση ανοσιακών απαντήσεων που είναι πιο ειδικές για το *M. tuberculosis*. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νεότερες ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές που ανιχνεύουν την παραγωγή ιντερφερόνης- γ (INF- γ) in vitro από τα T λεμφοκύτταρα.^{1,2} Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην αρχή ότι τα T λεμφοκύτταρα ατόμων που έχουν ευαισθητοποιηθεί στα αντιγόνα του *M. tuberculosis* παράγουν INF- γ in vitro, όταν διεγερθούν από αντιγόνα του μικροοργανισμού.^{1,2} Η παραγωγή INF- γ στην περίπτωση αυτή είναι ενδεικτική φυματιώδους λοίμωξης. Η αρχική έρευνα σχετικά με τις μεθόδους ανίχνευσης INF- γ χρησιμοποίησε ως αντιγόνο διέγερσης κεκαθαρμένη φυματίνη (purified protein derivative, PPD). Οι νεότερες μέθοδοι χρησιμοποιούν αντιγόνα ειδικά για την ομάδα του *M. tuberculosis*, όπως είναι τα αντιγόνα ESAT-6 (early secretory antigenic target-6) και CFP10 (culture filtrate protein 10) και τελευταία το TB7.7 τα οποία υπάρχουν στο *M. tuberculosis* και όχι στα άτυπα μυκοβακτηρίδια (εκτός από τα *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*) ή στο *M. bovis* το οποίο χρησιμοποιείται στο BCG.^{1,2} Ας σημειωθεί ότι τα αντιγόνα αυτά υπάρχουν στα στελέχη *M. bovis* τα οποία προκαλούν νόσο.

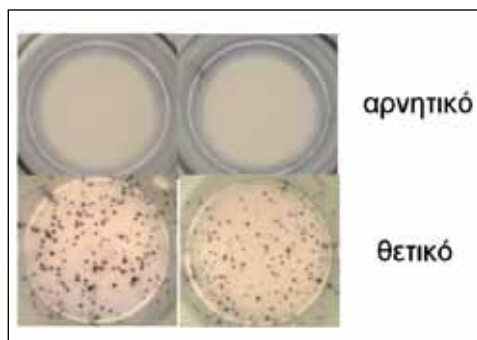
Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση παραγωγής INF- γ από τα T λεμφοκύτταρα ανήκουν σε δύο κατηγορίες. Η μία περιλαμβάνει τη μέθοδο ELISpot (T.SPOT.TB) ενώ η άλλη τις μεθόδους ELISA (Εικόνες 1, 2, 3).¹⁻³



Εικόνα 1. Λειτουργία της δοκιμασίας T SPOT™.

Η μέθοδος ELISpot (T.SPOT.TB, Oxford Immunotech) απαιτεί διαχωρισμό των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος του ασθενούς μετά την αιμοληψία με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια έκπλυση, καταμέτρηση και επώαση αυτών με τα αντιγόνα ESAT-6 και CFP-10 σε μία πλάκα με 96 βοθρία για 16-20 ώρες. Εάν ο ασθενής έχει μολυνθεί με το *M. tuberculosis* τα κύτταρά του αναγνωρίζουν τα αντιγόνα και παράγουν INF-γ η οποία συνδέεται με ειδικά αντισώματα που βρίσκονται στον πυθμένα του κάθε βοθρίου (Εικόνα 1). Η παρουσία αντισωμάτων κατά της ιντερφερόνης διαπιστώνεται με δεύτερο αντισώμα συζευγμένο με ένζυμο που καταλύει μια χρωματομετρική αντίδραση. Αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι η εμφάνιση ορατών κηλίδων. Η κάθε μια από τις κηλίδες αντιστοιχεί σε ένα Τ κύτταρο που έχει απαντήσει στο αντιγόνο (Εικόνα 1 και 2).¹⁻³

Για την εκτέλεση της μεθόδου ELISA λαμβάνεται ολικό αίμα και επωάζεται με τα αντι-



Εικόνα 2. Σχηματισμός κηλίδων στο T. SPOT. TB.

γόνα ESAT-6 και CFP-10 σε μία πλάκα με 24 βοθρία (QuantiFERON -TB Gold, Cellestis, Victoria, Australia) (QFT-G) ή με τα αντιγόνα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7 στον ίδιο σωλήνα με τον οποίο έγινε η αιμοληψία για 16-24 ώρες (QuantiFERON -TB Gold In-tube, Cellestis, Victoria, Australia) (QFT-IT) (Εικόνα 3). Εάν ο ασθενής έχει μολυνθεί με το *M. tuberculosis* τα κύτταρά του αναγνωρίζουν τα αντιγόνα και παράγουν INF-γ. Στη συνέχεια, η πλάκα ELISA ή το αρχικό σωληνάριο φυγοκεντρούνται και το πλάσμα μεταφέρεται σε μία πλάκα με 96 βοθρία. Η INF-γ συνδέεται με ειδικά

αντισώματα που βρίσκονται στον πυθμένα του κάθε βοθρίου. Η παρουσία αντισωμάτων κατά της INF-γ διαπιστώνεται με ένα δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο που καταλύει μια χρωματομετρική αντίδραση. Η οπτική πυκνότητα στο κάθε βοθρίο μετρείται και η συγκέντρωση της INF-γ προσδιορίζεται με τη χρήση μιας καμπύλης.¹⁻³

Το QuantiFERON-TB Gold® έχει εγκριθεί τις Η.Π.Α. από το 2005 για χρήση σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιείται η φυματινοαντίδραση, όπως στη διερεύνηση επαφών ασθενών με ενεργό φυματίωση και στον προσυμπτωματικό έλεγχο των μεταναστών.⁴ Μετά τις συστάσεις στις Η.Π.Α. για τη χρήση του QTF-G προτάθηκε στη Μ. Βρετανία (National Institute of Health and Clinical Excellence) η διπλή στρατηγική (με φυματινοαντίδραση αρχικά και επί θετικού αποτελέσματος δοκιμασία παραγωγής ιντερφερόνης για επιβεβαίωση) ως η οικονομικά πλέον αποδοτική για τον έλεγχο των ατόμων που έρχονται σε επαφή με πάσχοντες.⁵

Στους Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες δημοσιευμένες μελέτες για τη διάγνωση της ενεργού και της λανθάνουσας φυματίωσης στα παιδιά αντίστοιχα.⁶⁻⁹

Αξιοπιστία ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων στους ενηλίκους

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει με τις νέες αυτές διαγνωστικές μεθόδους σε ενηλίκους. Οι ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι είναι πιο ειδικές από τη φυματινοαντίδραση και έχουν ιδιαίτερη χρησιμότητα σε άτομα που έχουν εμβολιασθεί με το BCG.

Στη διάγνωση της φυματίωσης με καλλιέργεια θετική, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι οι ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι είναι περισσότερο ευαίσθητες σε σύγκριση με τη φυματινοαντίδραση και η ELISpot είχε την υψηλότερη ευαισθησία. Η ευαισθησία του QTF-G έχει βρεθεί κάπως υψηλότερη σε σύγκριση με το QTF-IT.^{4,10}

Η αξιοπιστία των μεθόδων αυτών στη διάγνωση της νόσου σε ανοσοκατασταλμένους

Πίνακας 1. Δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τη διάγνωση της ενεργού φυματίωσης στα παιδιά.

<i>Συγγραφέας, περιοδικό, χώρα</i>	<i>Μέθοδος</i>	<i>Αριθμός ασθενών</i>	<i>Ευαισθησία</i>	<i>Σχόλια</i>
Liebeschuetz S, Lancet 2004, Ν. Αφρική	ELISpot	133 με ενεργό TB	ELISpot 83% Mantoux 63% Μαζί 91%	ELISpot δεν επηρεάζεται από ηλικία, HIV, δυστροφία
Nicol MP CID 2005, Ν. Αφρική	ELISpot	12 βέβαιη 47 πιθανή TB 11 ύποπτη	10/12 (83%) 34/47 (72%) 5/11 (45%)	
Detjen AK, CID 2007, Γερμανία	QTF-IT vs. ELISpot	28 βέβαιη TB 23 λεμφδ/δα από άτυπα 22 αναπνευστικές λοιμώξεις	QTF-IT 93% ELISpot 93% Mantoux 100%	Ειδικότητα QTF-IT 100% ELISpot 100% Mantoux 10%-100%
Connell T CID 2006, Αυστραλία	QTF-G vs. Mantoux	Νεογνό 18 ημερών Βρέφος 13 εβδομάδων κεγχροειδή	QTF-G (+) Mantoux (-)	

ασθενείς ή ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια δεν έχει μελετηθεί αρκετά, φαίνεται όμως ότι η ELISpot είναι πιο ευαίσθητη από τη φυματινοαντίδραση.^{1-4,10}

Η αξιοπιστία των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης είναι εξαιρετικά δύσκολο να εκτιμηθεί αφού δεν υπάρχει κάποια δοκιμασία που με μεγάλη ακρίβεια να θέτει τη διάγνωση (gold standard). Από πολλούς έχει εκφραστεί η επιφύλαξη ότι δεν έχουν μελετηθεί αρκετά οι μέθοδοι αυτές ώστε να υποκαταστήσουν τη φυματινοαντίδραση και ίσως ήταν πρόωρη η απόφαση για χρήση τους στην καθημερινή κλινική πράξη.^{1,2}

Σε ασθενείς με υψηλό βαθμό έκθεσης σε πάσχοντες η ευαισθησία των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων έχει βρεθεί ισοδύναμη με τη δερμοαντίδραση Mantoux.^{1,2,10}

Η επίδραση της αντιφυματικής θεραπείας δεν έχει μελετηθεί αρκετά, σε κάποιες μελέτες όμως έχει δειχθεί ότι με την χορήγηση θεραπείας και τη μείωση των ζωντανών βακίλων οι ανοσοδιαγνωστικές δοκιμασίες αρνητικοποιούνται.⁷

Αξιοπιστία ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων στα παιδιά

Η εμπειρία από την χρήση των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων στα παιδιά είναι πιο περιορισμένη σε σύγκριση με τους ενηλίκους.

Μικρός αριθμός μελετών σε παιδιά με βακτηριολογικά αποδεδειγμένη ενεργό νόσο έχει δείξει ότι η ευαισθησία του ELISpot κυμαίνεται μεταξύ 83%-93% και είναι ισοδύναμη ή υψηλότερη της φυματινοαντίδρασης (63%-100%) (Πίνακας 1).⁶⁻⁹ Σε μία μελέτη που περιέλαβε υψηλό ποσοστό παιδιών με HIV λοίμωξη η ευαισθησία του ELISpot ήταν επίσης υψηλότερη.⁶ Οι μέθοδοι ELISA έχουν μελετηθεί σε μικρότερο αριθμό ασθενών με ενεργό νόσο σε σύγκριση με το ELISpot. Σε μελέτη με δύο περιστατικά περιγεννητικής μετάδοσης το QTF-G ήταν θετικό ενώ η φυματινοαντίδραση αρνητική.¹¹ Το QTF-IT εξετάστηκε σε μία μελέτη σε σύγκριση με το ELISpot και τη φυματινοαντίδραση σε παιδιά με ενεργό νόσο (n=28) στη Γερμανία και βρέθηκε ότι οι δυο μέθοδοι ήταν ισοδύναμες με ευαισθησία 93% ενώ η ευαισθησία της φυματινοαντίδρασης ήταν 100%.⁸ Η ειδικότητα των μεθόδων εξετάστηκε σε παιδιά με αποδεδειγμένη λοίμωξη από άτυπα μυκοβακτηρίδια και υπολογίστηκε σε 98%-100% ενώ η αντίστοιχη της φυματινοαντίδρασης ήταν 58%.⁸

Όπως στους ενηλίκους, έτσι και στα παιδιά, η ευαισθησία των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί (Πίνακας 2). Σε μελέτες που εξέτασαν τη φυματινοαντίδραση και την ELISpot συγκριτικά κατά τη διάρκεια επιδημικών εξάρσεων σε σχολεία διαπιστώθηκε ότι υπάρχει καλή συσχέτιση του αποτελέσματος των δύο μεθόδων και στις περισσότερες υπήρχε καλύτερη συσχέτιση του θετικού αποτελέσματος της ELISpot με το βαθμό έκθεσης.^{12,13} Οι μέθοδοι ELISA έχουν μελετηθεί λιγότερο. Το QTF-G βρέθηκε ότι έχει χαμηλή ευαισθησία σε μία μελέτη από την Αυστραλία αφού ήταν αρνητικό σε 70% των παιδιών που θεωρήθηκε ότι έχουν μολυνθεί σύμφωνα με το αποτέλεσμα της φυματινοαντίδρασης.⁹ Σε διάφορες μελέτες το αποτέλεσμα του QTF-G είναι σε ένα ποσοστό ασθενών απροσδιόριστο, ιδιαίτερα σε παιδιά μικρής ηλικίας και σε ανοσοκατασταλαμένους.^{1,2,9} Το QTF-IT φαίνεται ότι δίνει λιγότερο συχνά απροσδιόριστο αποτέλεσμα. Η τελευταία μέθοδος έχει βρεθεί ισοδύναμη ή πιο ευαίσθητη από την φυματινοαντίδραση στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης σε άλλες μελέτες.^{14,15} Σε αρκετές μελέτες διαπιστώνεται ότι το αποτέλεσμα της φυματινοαντίδρασης είναι συχνότερα θετικό σε σύγκριση με τις ανοσοδιαγνωστικές μεθόδους.^{16,17}

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι στη διάγνωση της ενεργού νόσου στα παιδιά οι νέες μέθοδοι είναι ισοδύναμες ή καλύτερες από τη φυματινοαντίδραση. Η ELISpot φαίνεται ότι

Πίνακας 2. Οι ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματιώδους λοίμωξης στα παιδιά.

<i>Συγγραφέας, περιοδικό, χώρα</i>	<i>Μέθοδος</i>	<i>N</i>	<i>Ευαισθησία</i>
Connell Thorax, 2006, Αυστραλία	QFT-G vs. Mantoux	106 υψηλού κινδύνου για λοίμωξη ή νόσο	QFT-G χαμηλή ευαισθησία, απροσδιόριστα
Dogra S, J Infect 2006, Ινδία	QFT-IT vs. Mantoux	105 με πιθανή νόσο ή επαφή (8 με νόσο)	QFT-IT ισοδύναμο με Mantoux
Ferrara G, Lancet 2006, Ιταλία	QFT-G vs. ELISpot vs. Mantoux	393 με πιθανή ενεργό ή λανθάνουσα TB	ELISpot > QFT-G QFT-G απροσδιόριστα
Tsiouris SJ, IJTULD 2006, N. Αφρική	QFT-IT vs. Mantoux	183 παιδιά σε αυξημένο κίνδυνο για λανθάνουσα TB	Mantoux πιο πολλά θετικά QFT-IT όχι απροσδιόριστα
Nakaoka H, Emerg Infect Dis 2006, Νιγηρία	QFT-IT vs. Mantoux	175 επαφή με πάσχοντα 39 ομάδα ελέγχου	QFT-IT > Mantoux

έχει μεγαλύτερη ευαισθησία, ενώ οι μέθοδοι ELISA πρέπει να μελετηθούν περισσότερο. Στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης οι ανοσοδιαγνωστικές μέθοδοι έχουν υψηλότερη ειδικότητα διότι δεν επηρεάζονται από τη λοίμωξη με άτυπα μυκοβακτηρίδια και τον εμβολιασμό με BCG και μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα χρήσιμες όταν ελέγχονται εμβολιασμένα παιδιά.¹⁻³ Η ευαισθησία όμως των πιο πάνω δοκιμασιών είναι δύσκολο να υπολογιστεί αφού δεν υπάρχει μέθοδος που με ακρίβεια να θέτει τη διάγνωση της φυματιώδους λοίμωξης.

Πίνακας 3. Προοπτικές για μελλοντική έρευνα με σκοπό τον ακριβέστερο προσδιορισμό του ρόλου των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων παραγωγής ιντερφερόνης γ από τα T λεμφοκύτταρα στη διάγνωση της φυματίωσης και της φυματιώδους μόλυνσης.

- Μελέτη της αξιοπιστίας των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων στη διάγνωση της φυματίωσης και της λανθάνουσας φυματίωσης στα παιδιά και στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Εκτίμηση των μεθόδων αυτών στη διάγνωση των διαφόρων μορφών φυματίωσης, πνευμονικής και εξωπνευμονικής.
- Προσδιορισμός της συχνότητας ανάπτυξης φυματίωσης σε άτομα στα οποία διαπιστώνεται λανθάνουσα φυματίωση με βάση τις μεθόδους αυτές, ενώ η φυματινοαντίδραση είναι αρνητική.
- Μελέτη των μεταβολών των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών αυτών κατά τη διάρκεια της θεραπείας τόσο της λανθάνουσας φυματίωσης όσο και της νόσου. Εκτίμηση της δυνατότητας χρήσης τους για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.
- Μελέτη των δυναμικών μεταβολών στο μέγεθος της απάντησης που μετρείται με τις μεθόδους αυτές, ώστε να χρησιμεύσουν ως πρώιμος δείκτης της εξέλιξης προς νόσο, πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων.
- Προσδιορισμός του χρόνου που απαιτείται από την επαφή με πάσχοντα μέχρι τη θετικοποίηση των δοκιμασιών αυτών.
- Μελέτη της δυνατότητας διάγνωσης της επαναλοίμωξης, εάν συμβεί, μετά χορήγηση θεραπείας για νόσο ή για λανθάνουσα φυματιώδη λοίμωξη.
- Μελέτη της σχέσης του κόστους προς το όφελος και της πρακτικότητας της εφαρμογής τους.

Σε μερικές μελέτες η φυματινοαντίδραση δίνει συχνότερα θετικό αποτέλεσμα σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε πάσχοντα δεν είναι όμως γνωστό αν αυτό οφείλεται στην υψηλότερη ευαιθησία της ή σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω λοίμωξης με άτυπα μυκοβακτηρίδια ή εμβολιασμού με BCG.^{16,17} Επιπρόσθετα, αντίθετα με τη φυματινοαντίδραση, δεν υπάρχουν σήμερα δεδομένα σχετικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης νόσου σε άτομα τα οποία έχουν θετική κάποια ανοσοδιαγνωστική δοκιμασία. Μόνο με τη μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών αυτών μπορεί να απαντηθεί το ερώτημα εάν το θετικό αποτέλεσμα δείχνει λοίμωξη με ζωντανούς μικροοργανισμούς και προσδιορίζει την ανάπτυξη νόσου στο μέλλον. Πρόσφατα, μάλιστα, υπήρξε η πρώτη αναφορά περίπτωσης βρέφους με θετική ELISpot και αρνητική φυματινοαντίδραση που στη συνέχεια ανέπτυξε φυματίωση.¹⁸

Ανάγκη για μελλοντική έρευνα

Η χρήση των νεότερων μεθόδων παραγωγής INF- γ στην κλινική πράξη θα πρέπει να μελετηθεί περισσότερο και πολλά ερωτήματα μένουν να απαντηθούν. Τα ερωτήματα αυτά περιγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 761-776.
2. Lalvani A, Milington KA. T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 264-271.
3. Starke J. Interferon- γ release assays for diagnosis of tuberculosis infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 941-942.
4. Mazurek GH, Jereb J, LoBue B, Iademarco MF, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR* 2005; 54(RR15): 49-55.
5. National Institute of Health and Clinical Excellence. Clinical diagnosis and management of tuberculosis and measures for its prevention and control. Clinical guidance 33. March 2006.
6. Liebeschuetz S, Bmaber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lavani A. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet* 2004; 364: 2196-2203.
7. Nicol MP, Pienaar D, Wood K, Eley B, Wilkinson RJ, Henderson H, et al. Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10 and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring of therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1301-1308.
8. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, et al. Interferon- γ release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 322-328.
9. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of a whole blood interferon γ assay in detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax* 2006; 61: 616-620.
10. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 2007; 146: 340-354.
11. Connell T, Bar-Zeev N, Curtis N. Early detection of perinatal tuberculosis using a whole blood

- interferon- γ release assay. *Clin Infect Dis* 2006; 42: e82-85.
12. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Resp Crit Care Med* 2004; 170: 65-69
 13. Anderson ST, Williams AJ, Brown JR, Newton SM, Simsova M, Nicol MP, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* undetected by tuberculin skin testing *Am J Resp Crit Care Med* 2006; 173: 1038-1042.
 14. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, Chaturvedi P, Reingold AL, Colford, JM, et al. Comparison of a whole blood interferon- γ assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect* 2007; 54: 267-276.
 15. Nakaoka H, Lawson L, Squire SB, Coulter B, Ravn P, Brock I, et al. Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1383-1388.
 16. Ferrara G, Losi M, Roversi P, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Clin Infect Dis* 2006; 367: 1328-1334.
 17. Tsiouris SJ, Austin J, Toro P, Coetzee D, Weyer K, Stein Z, et al Results of a tuberculosis-specific IFN- γ assay in children at high-risk for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 939-941.
 18. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Millington K, Fabbri LM, et al. T-cell based diagnosis of neonatal multidrug-resistant tuberculosis infection. *Pediatrics* 2007; 119; e1-e5.

Κυτταρικά στοιχεία και δείκτες φλεγμονής σε προκλητά πτύελα

Λ. Τσαρτσάλη, Α. Bush

Η πρόκληση πτυέλων αποτελεί μη επεμβατική μέθοδο εκτίμησης της φλεγμονής των αεραγωγών στο άσθμα και σε άλλα νοσήματα του αναπνευστικού. Στόχος της είναι η συλλογή ικανοποιητικής ποσότητας εκκρίσεων από τους κατώτερους αεραγωγούς σε άτομα που δεν μπορούν να αποχρέψουν αυτόματα. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισπνοή ισότονου ή υπέρτονου διαλύματος φυσιολογικού ορού που χορηγείται με νεφελοποιητή.

Χρησιμοποιείται ως ερευνητικό εργαλείο για τη μελέτη του παιδικού άσθματος από το 1992 που περιγράφηκε η τεχνική.¹

Τα πτύελα αποτελούνται από μείγμα βλέννης, φλεγμονωδών και επιθηλιακών κυττάρων και προϊόντων κυτταρικής αποδόμησης που προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Στα φυσιολογικά άτομα τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι κυρίως ουδετερόφιλα και μακροφάγα με μικρούς αριθμούς λεμφοκυττάρων, ηωσινοφίλων, μαστοκυττάρων και βασεόφιλων κυττάρων. Η σχέση αυτή διαταράσσεται όταν υπάρχει φλεγμονή των αεραγωγών με επικράτηση είτε των ηωσινοφίλων είτε των ουδετεροφίλων.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ, ΑΣΦΑΛΕΙΑ

Έχει εφαρμοσθεί ικανός αριθμός πρωτοκόλλων για την πρόκληση πτυέλων στα παιδιά. Το 2002 η Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες για την τεχνική σύμφωνα με τις οποίες:²

- Πριν από την έναρξη της διαδικασίας θα πρέπει να δίνονται στους ασθενείς αναλυτικές πληροφορίες για το τι πρόκειται να ακολουθήσει.
- Η ασφάλεια του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται ελέγχεται κάθε φορά.
- Προσδιορίζεται ο βίαια εκπνεόμενος όγκος σε ένα sec (FEV₁) πριν από τη χορήγηση βρογχοδιασταλτικού.
- Χορηγούνται 200μg εισπνεόμενης σαλβουταμόλης με αεροθάλαμο πριν από την έναρξη.
- Μετά από 10 min προσδιορίζεται ο FEV₁ μετά από βρογχοδιαστολή.
- Χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση διαλύματος φυσιολογικού ορού (3% ή 4,5%) ή προσοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (3%, 4% και 5%).
- Η πρόκληση πραγματοποιείται με διαλείμματα κάθε 5 min για ≤20 min. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί για 1, 4 και 5 min και να ακολουθήσουν τρεις επιπλέον πεντάλεπτες περιόδους.

- Ο FEV₁ πρέπει να μετράται σε κάθε διάλειμμα και η διαδικασία να διακόπτεται εφόσον παρατηρηθεί μείωση της τιμής $\geq 20\%$ συγκριτικά με την τιμή μετά από βρογχοδιαστολή ή εφόσον ο ασθενής παρουσιάσει κάποιο σύμπτωμα.
- Ζητείται από τον ασθενή να βήξει και να αποχρέμψει μετά από 5, 10, 15 και 20 min πρόκλησης ή όποτε αυτός νιώσει έτοιμος.
- Εναλλακτικά, σε ασθενείς υψηλού κινδύνου να παρουσιάσουν βρογχόσπασμο (σοβαρό άσθμα) προτείνεται η έναρξη της πρόκλησης με εισπνοή 0,9% φυσιολογικού ορού και η πραγματοποίηση της για 30 sec, 1 και 5 min με στενή παρακολούθηση του FEV₁. Επί αποτυχίας, η συγκέντρωση του εισπνεόμενου διαλύματος σε NaCl αυξάνει σε 3% και η πρόκληση πραγματοποιείται για 30 sec, 1 και 2 min. Αν και αυτό αποτύχει η συγκέντρωση αυξάνεται σε 4,5% NaCl και η πρόκληση γίνεται για 30 sec, 1, 2, 4 και 8 min.
- Κατά την απόχρεμψη συνήθως υπάρχει πρόσμιξη με ποικίλη ποσότητα σάλου που έχει πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα καθώς επίσης και με εκκρίσεις του ρινοροφάρυγγα. Αυτό μπορεί να περιοριστεί με τον καθαρισμό της μύτης και την έκπλυση του στόματος.

Τα ποσοστά επιτυχίας που αναφέρονται στις διάφορες μελέτες που αφορούν σε παιδιά ηλικίας 6-18 ετών κυμαίνονται από 68-100% και εξαρτώνται από:

- Το επίπεδο ελέγχου του άσθματος. Υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας αναφέρονται στο μη ελεγχόμενο άσθμα συγκριτικά με το ελεγχόμενο άσθμα.³
- Την ηλικία. Στη μελέτη των Lex και συν⁴ αναφέρεται ποσοστό επιτυχίας 50% σε παιδιά ηλικίας <12 ετών, ενώ σε παιδιά ηλικίας ≥ 12 ετών το ποσοστό ανέρχεται σε 87%.
- Την ωσμωτικότητα του διαλύματος που χρησιμοποιείται για την πρόκληση. Η χρήση διαλύματος υπέρτονου φυσιολογικού ορού συνδυάζεται με υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας, μεγαλύτερη ποσότητα πτυέλων και μικρότερης διάρκειας διαδικασία για τη συλλογή του δείγματος συγκριτικά με το διάλυμα ισότονου φυσιολογικού ορού.⁵

Έχει επίσης βρεθεί ότι οι πιο έμπειροι και ενθουσιώδεις ερευνητές είναι πιο πιθανό να πετύχουν τη λήψη δείγματος, ενώ τα επίπεδα του εκπνεόμενου μονοξειδίου του αζώτου (FeNO) πριν από τη διαδικασία συνιστούν προγνωστικό δείκτη για επιτυχή πρόκληση.⁶

Πρόκειται για ασφαλή τεχνική που μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και σε παιδιά που βρίσκονται σε ασθματικό παροξυσμό,³ καθώς και σε παιδιά που παρουσιάζουν δύσκολο άσθμα (επίμονη συμπτωματολογία παρά την εφαρμογή θεραπείας με υψηλές δόσεις εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών).⁴

Είναι ωστόσο γνωστό ότι η εισπνοή υπέρτονου ή ακόμη και ισότονου φυσιολογικού ορού μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα βρογχόσπασμου σε ασθματικούς ασθενείς και ειδικότερα σε αυτούς που παρουσιάζουν βρογχική υπεραπαντητικότητα. Αυτό συνήθως προλαμβάνεται με τη χορήγηση εισπνεόμενης σαλβουταμόλης πριν από την έναρξη της διαδικασίας της πρόκλησης. Άλλες ανεπιθύμητες αντιδράσεις που έχουν αναφερθεί περιλαμβάνουν βήχα, εμετούς και ανησυχία.⁷

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΤΥΕΛΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗ ΛΗΨΗ

Προσδιορισμός των κυτταρικών στοιχείων

Μετά από τη λήψη του δείγματος πτυέλων τα κυτταρικά στοιχεία σταδιακά θα εκφυλιστούν. Η ταχύτητα με την οποία επέρχεται η εκφύλιση και οι πιθανοί τρόποι αποφυγής της δεν έχουν μελετηθεί. Για το λόγο αυτό προτείνεται η επεξεργασία του δείγματος να γίνεται μέσα σε δύο ώρες από τη λήψη του το πολύ, και σε περίπτωση καθυστέρησης να φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4 °C.

Έχουν περιγραφεί δύο τεχνικές επεξεργασίας. Η πρώτη αφορά στην επιλογή μόνο των παχύρρευστων συστατικών του δείγματος με τη βοήθεια μικροσκοπίου (επιλεκτική μέθοδος),¹ ενώ η δεύτερη αφορά στην επεξεργασία ολόκληρου του δείγματος που περιλαμβάνει και ποικίλη ποσότητα σιάλου.⁸ Και οι δύο μέθοδοι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Με την επιλεκτική μέθοδο ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυτταρικών στοιχείων καθίσταται ευκολότερος και ταχύτερος, δεδομένου ότι τα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα είναι λιγότερο από το 5% (όταν απομακρυνθεί ο σιάλος), ενώ η συγκέντρωση των χημικών μεσολαβητών δεν επηρεάζεται από την ταυτόχρονη παρουσία σιάλου.

Το πλεονέκτημα της χρήσης ολόκληρου του δείγματος είναι ότι η επεξεργασία του πραγματοποιείται πιο γρήγορα, αλλά υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων των κυτταρικών στοιχείων είναι μικρότερη εφόσον τα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα (που υποδηλώνουν παρουσία σιέλου) είναι >20% του συνολικού αριθμού των κυττάρων.⁹ Υπάρχουν επίσης αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με το αν τα ποσοστά των κυτταρικών στοιχείων διαφέρουν μεταξύ των δύο μεθόδων. Σε μία μελέτη αναφέρεται υψηλότερο ποσοστό ηωσινοφίλων όταν η επεξεργασία των πτυέλων γίνεται με την επιλεκτική μέθοδο συγκριτικά με τη χρήση ολόκληρου του δείγματος,¹⁰ αλλά αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί σε άλλες μελέτες.¹¹

Στις περισσότερες μελέτες στα παιδιά η επεξεργασία των προκλητών πτυέλων έχει γίνει με την επιλεκτική μέθοδο.

Οι τιμές των κυτταρικών στοιχείων στα πτύελα υγιών παιδιών έχουν αναφερθεί από τον Cai και συν¹² (Πίνακας 1). Το κυρίαρχο κύτταρο στα φυσιολογικά πτύελα (Εικόνα 1) είναι το μακροφάγο και ως ανώτερο φυσιολογικό όριο για τα ηωσινόφιλα έχει τεθεί το 2,5%. Με βάση τον αριθμό των ηωσινοφίλων και των ουδετεροφίλων έχουν περιγραφεί οι ακόλουθοι φλεγμονώδεις φαινότυποι στο άσθμα:¹³

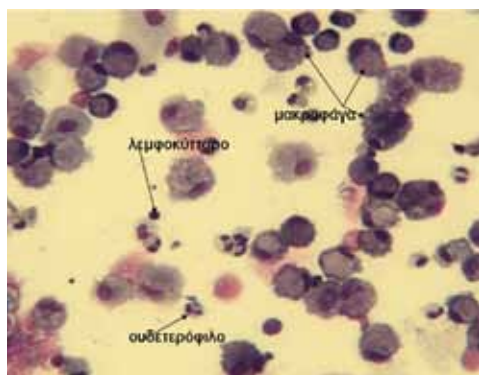
- ηωσινοφιλικός φαινότυπος (ηωσινόφιλα $\geq 2,5\%$) (Εικόνα 2)
- ουδετεροφιλικός φαινότυπος (ουδετερόφιλα $\geq 54\%$) (Εικόνα 3)
- μεικτός φαινότυπος (ουδετερόφιλα $\geq 54\%$ και ηωσινόφιλα $\geq 2,5\%$) (Εικόνα 4).

Προσδιορισμός των δεικτών φλεγμονής στη διαλυτή φάση των πτυέλων

Ο υπερκείμενος ορός που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση του κυτταρικού διαλύματος του δείγματος πτυέλου μπορεί να αποθηκευτεί στη βαθιά κατάψυξη ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) και η

Πίνακας 1. Σύγκριση των κυτταρικών στοιχείων σε προκλητά πτύελα μεταξύ υγιών και ασθματικών παιδιών. Οι παραπάνω τιμές παρουσιάζονται ως διάμεσες και διακυμάνσεις 25-75%.¹²

	Υγιή παιδιά (N=72)	Ασθματικά παιδιά (N=42)
Συνολικός αριθμός κυττάρων ($\times 10^6 \text{ cells/mL}$)	1,5 (0,8-3,9)	2,2 (1,07-4,65)
Ηωσινόφιλα (%)	0,3 (0-1,05)	4,25 (1,5-14,1)
Ουδετερόφιλα (%)	35 (12-88,25)	43 (26-57,3)
Μακροφάγα (%)	56 (10,5-77,25)	37 (17,5-46,8)
Λεμφοκύτταρα (%)	0,5 (0-1,5)	0,5 (0-1,5)
Επιθηλιακά κύτταρα (%)	1,5 (0,75-3)	14 (6-19,4)



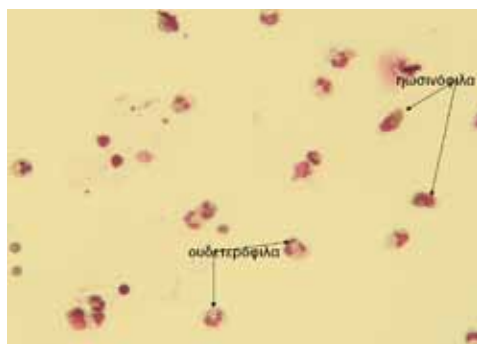
Εικόνα 1. Φυσιολογικά πτύελα. Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x20).



Εικόνα 3. Πτύελα ασθματικού παιδιού με ουδετεροφιλικό φαινότυπο. Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x20).



Εικόνα 2. Πτύελα ασθματικού παιδιού με ηωσινοφιλικό φαινότυπο. Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x20).



Εικόνα 4. Πτύελα ασθματικού παιδιού με μεικτό φαινότυπο. (Από το προσωπικό αρχείο της Λ. Τσαρτσάλη) Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x20).

επεξεργασία του να γίνει σε δεύτερο χρόνο. Μεγάλος αριθμός φλεγμονωδών μεσολαβητών έχει προσδιοριστεί στη διαλυτή φάση των πτυέλων.¹⁴ Σε αυτούς περιλαμβάνονται:

1. Κυτταροκίνες, όπως ο GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), οι ιντερλευκίνες IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, ο TNF α (tumor necrosis factor α), ο TGF β 1 (transforming growth factor β 1), η ET-1 (endothelin -1) και η IF- γ (interferon- γ).
2. Διαλυτοί υποδοχείς κυτταροκινών, όπως ο ανταγωνστής του υποδοχέα της IL1 (IL-1ra), ο τύπου II διαλυτός υποδοχέας του TNF (sTNFRII) και ο sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1).
3. Χημειοκίνες, όπως η ηωταξίνη, η IL-8, ο παράγοντας RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted), η MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) και η MIP-1a (macrophage inflammatory protein-1a).
4. Ηωσινοφιλικές πρωτεΐνες, όπως η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (ECP), η ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (EPO), η ηωσινοφιλική πρωτεΐνη Χ ή η νευροτοξίνη που παράγεται από τα ηωσινόφιλα (EPX/EDN) και η μείζων βασική πρωτεΐνη (MBP).

5. Ουδετεροφιλικές πρωτεΐνες, όπως η μυελοπεροξειδάση (MPO), η ανθρώπινη ουδετεροφιλική λιποκαλίνη (HNL), οι καθεψίνες G και B και η ανθρώπινη ουδετεροφιλική ελαστάση (HNE).
 6. Προϊόντα μαστοκυττάρων, όπως η ισταμίνη και η τρυπτάση.
 7. Δείκτες αγγειακής διαφυγής, όπως η αλβουμίνη, το ινωδογόνο και η α2 μακροσφαιρίνη.
 8. Εικοσανοειδή, όπως τα λευκοτριένια LTB4, LTC4, LTD4, LTE4 και οι προσταγλανδίνες PGD2, PGE2, TxB2, PGF2a.
 9. Πρωτεάσες/αναστολείς, όπως οι MMP-1 και MMP-9 (μεταλλοπρωτεϊνάσες 1 και 9), η TIMP-1 (ιστικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης), η SLPI (secretory leucocyte protease inhibitor) και η α1-AT (α1-αντιθρυψίνη).
 10. Διαλυτά προϊόντα του νιτρικού οξέος.
 11. Αταξινόμητοι μεσολαβητές, όπως η λακτοφερρίνη, η MLG (mucin like glycoprotein) και το εκκριτικό στοιχείο της ανοσοσφαιρίνης IgA (IgA SC).
- Η χρήση του DTT (dithiothreitol) (βλεννολυτικός παράγοντας που βοηθά στην απελευθέρωση των παγιδευμένων κυττάρων από το δείγμα πτυέλων) έχει φανεί ότι δεν επηρεάζει τις μετρήσεις της ECP, των κυτταροκινών IL-8 και IL-5, της τρυπτάσης και της ανοσοσφαιρίνης IgA.^{15,16} Η προσθήκη αναστολέων των πρωτεασών πριν από την επεξεργασία του δείγματος φαίνεται ότι αυξάνει τα επίπεδα της κυτταροκίνης IL-5.¹⁷ Ωστόσο, η επαναληψιμότητα, ακρίβεια και αξιοπιστία πολλών από αυτές τις μετρήσεις στα πτύελα δεν έχει μελετηθεί επαρκώς και κατά συνέπεια η αξία τους είτε ως ερευνητικό και είτε ως κλινικό εργαλείο παραμένει αμφίβολη.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

Άσθμα

Αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων και επιθηλιακών κυττάρων έχει βρεθεί σε προκλητά πτύελα ασθματικών παιδιών συγκριτικά με εκείνα υγιών παιδιών.¹² Ο αριθμός των ηωσινοφίλων στα προκλητά πτύελα έχει επιπλέον συσχετιστεί με τη βαρύτητα και τη σταθερότητα του άσθματος καθώς και με την ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή. Έχει περιγραφεί σημαντική αύξηση του αριθμού των ηωσινοφίλων στα πτύελα κατά τη διάρκεια των ασθματικών παροξυσμών³ καθώς και στενή συσχέτιση τους με αντικειμενικούς δείκτες εκτίμησης της βαρύτητας του άσθματος όπως η αναπνευστική λειτουργία.¹⁸

Στη μελέτη των Cai και συν¹² ακόμη και τα παιδιά με ελεγχόμενο άσθμα είχαν υψηλότερες τιμές ηωσινοφίλων συγκριτικά με τα υγιή παιδιά. Επιπλέον, τα ατοπικά φυσιολογικά παιδιά ήταν πιο πιθανό να έχουν ηωσινόφιλα στα πτύελα συγκριτικά με τα μη ατοπικά, οδηγώντας στην υπόθεση ότι το ατοπικό προφίλ μπορεί να συνδυάζεται με ήπια φλεγμονή των αεραγωγών χωρίς καμία ένδειξη βρογχικής υπεραπαντητικότητας ή κλινικού άσθματος.

Οι Gibson και συν¹⁹ έδειξαν ότι με την αύξηση της κλινικής βαρύτητας του άσθματος υπάρχει σημαντική αύξηση του αριθμού των ηωσινοφίλων και επιθηλιακών κυττάρων στα προκλητά πτύελα, ενώ τα συμπτωματικά ασθματικά παιδιά έχουν σημαντικά αυξημένα ηωσινόφιλα και βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα συγκριτικά με τα ασυμπτωματικά ασθματικά παιδιά ανεξαρτήτως κλινικής βαρύτητας του άσθματος.

Στη μελέτη των Ryttila και συν²⁰ η θεραπεία με εισπνεόμενο κορτικοστεροειδές παράλληλα με την κλινική βελτίωση και τη βελτίωση της αναπνευστικής λειτουργίας φάνηκε ότι περιορίζει και τον αριθμό των ηωσινοφίλων στα προκλητά πτύελα.

Ωστόσο, αν και ο αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό του άσθματος, μελέτες που έχουν βασιστεί στη λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), βρογχικών βιοψιών και προκλητών πτυέλων, έχουν αναδείξει και μη ηωσινοφιλικές μορφές, οι οποίες φαίνεται ότι εκπροσωπούν έως και 50% του παιδικού άσθματος ανεξαρτήτως ηλικίας.²¹

Επιπλέον, έχουν περιγραφεί και μη φλεγμονώδεις φαινότυποι του άσθματος.²²

Σε κάθε περίπτωση, η ανεύρεση ηωσινοφίλων στα πτύελα αποκτά κλινική σημασία γιατί προβλέπει θετική ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή και μπορεί να αποτελέσει οδηγό στις θεραπευτικές αποφάσεις.

Μελέτες σε ενηλίκους έχουν δείξει ότι θεραπευτικές παρεμβάσεις που βασίζονται στην ελάττωση του αριθμού των ηωσινοφίλων στα πτύελα οδηγούν σε μείωση του αριθμού και της βαρύτητας των ασθματικών παροξυσμών.²³

Οι Zacharaciewicz και συν²⁴ έδειξαν για πρώτη φορά στα παιδιά ότι τα ηωσινόφιλα στα πτύελα μπορεί να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη επικείμενης απώλειας ελέγχου του άσθματος στην προσπάθεια μείωσης της θεραπείας με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή.

Ειδικότερα στο σοβαρό άσθμα που αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των ασθματικών παιδιών έχει προταθεί στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση με οδηγό τον τύπο της φλεγμονής των αεραγωγών, όπως αυτός καθορίζεται από την ανάλυση των πτυέλων πριν και μετά τη χορήγηση συστηματικού κορτικοστεροειδούς.²⁵ Έτσι, με βάση τα ευρήματα στα προκλητά πτύελα έχουν χαρακτηριστεί οι ακόλουθοι φλεγμονώδεις φαινότυποι σοβαρού άσθματος:

- ηωσινοφιλικό άσθμα ευαίσθητο στα κορτικοστεροειδή,
- ηωσινοφιλικό άσθμα ανθεκτικό στα κορτικοστεροειδή,
- ουδετεροφιλικό άσθμα ανθεκτικό στα κορτικοστεροειδή,
- άσθμα χωρίς φλεγμονή με επίμονη βρογχική υπεραπανθητικότητα.

Αν και η προσέγγιση αυτή φαίνεται αρκετά ελκυστική, τόσο ως προς την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του άσθματος, όσο και ως προς την πιο τεκμηριωμένη θεραπευτική στρατηγική απαιτούνται προοπτικές μελέτες για την επιβεβαίωση της αξίας της.

Κυστική ίνωση

Τα πτύελα έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών στην κυστική ίνωση. Σημαντικό βήμα στη μελέτη της πιθανής κλινικής αξίας των βιολογικών δεικτών στα πτύελα έχει αποτελέσει η προσπάθεια να συσχετιστούν με κλινικά αποτελέσματα, όπως η ανταπόκριση σε αντιβιοτική αγωγή, και σε αντιφλεγμονώδεις παράγοντες.

Προς το παρόν, υπάρχουν περιορισμένες ενδείξεις από μικρές μελέτες που υποστηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των βιολογικών δεικτών στα πτύελα και της βαρύτητας της νόσου, όπως αυτή καθορίζεται με βάση την αναπνευστική λειτουργία, την ακτινολογική βαθμολογία και την εκτίμηση της ποιότητας ζωής.

Οι Sagel και συν^{26,27} έχουν δείξει σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του FEV₁ και σημαντικού αριθμού δεικτών φλεγμονής στα προκλητά πτύελα, όπως ο αριθμός των ουδετεροφίλων, η IL-8, η ουδετεροφιλική ελαστάση και η μεταλλοπρωτεϊνάση 9 (MMP)-9 σε κλινικά σταθερά παιδιά με κυστική ίνωση με φυσιολογική έως ελαφρά επηρεασμένη αναπνευστική λειτουργία.

Παρομοίως, οι Kim και συν²⁸ κατέδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αναπνευστικής λειτουργίας και της IL-8 και μυελοπεροξειδάσης σε μεγαλύτερους ασθενείς με πιο προχωρημένη νόσο.

Σε ανασκόπηση πολλών κλινικών μελετών που πραγματοποιήθηκε μέσω του Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network (CFF TDN) δόθηκε η δυνατότητα να μελετηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ βιολογικών δεικτών στα πτύελα και παραμέτρων της αναπνευστικής λειτουργίας σε περισσότερους από 250 ασθενείς που προέρχονταν από διαφορετικά κέντρα.²⁹ Η μελέτη καταλήγει στην ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του FEV₁ και δεικτών φλεγμονής στα πτύελα, όπως η ελεύθερη ελαστάση, η IL-8 και ο αριθμός των ουδετεροφίλων.

Αυξημένοι δείκτες φλεγμονής στα πτύελα έχουν βρεθεί επίσης σε ασθενείς που παρουσιάζουν παρόξυνση συγκριτικά με ασθενείς που είναι κλινικά σταθεροί, καθώς επίσης και σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa*.^{30,31}

Απαιτούνται ωστόσο προοπτικές μελέτες για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων.

Άλλα νοσήματα

Λίγα είναι γνωστά για τα κυτταρικά στοιχεία των προκλητών πτυέλων στις διάμεσες πνευμονοπάθειες, αν και η σαρκοείδωση και η εξωγενής αλλεργική κυψελίτιδα συνδυάζονται με ευρήματα από τους αεραγωγούς και επομένως φαίνεται πιθανό να είναι χρήσιμη η μελέτη τους με αυτή τη μέθοδο.³² Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι τα προκλητά πτύελα δε φαίνεται να αποτελούν ικανοποιητικό τρόπο εκτίμησης της λεμφοκυτταρικής φλεγμονής των αεραγωγών λόγω του μικρού αριθμού λεμφοκυττάρων στα προκλητά πτύελα.

Τα προκλητά πτύελα αποτελούν επίσης χρήσιμο εργαλείο ανίχνευσης κοινών λοιμώξεων του αναπνευστικού στα παιδιά,³³ ενώ φαίνεται ότι είναι ασφαλής και χρήσιμη τεχνική για τη μικροβιολογική επιβεβαίωση της φυματίωσης.³⁴

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η εφαρμογή της λήψης πτυέλων με πρόκληση ως εξέταση ρουτίνας τουλάχιστον στην παρακολούθηση ασθενών με σοβαρό άσθμα έχει αποδειχθεί ότι δεν αυξάνει το κόστος αντιμετώπισης αυτής της ομάδας ασθενών από το Σύστημα Υγείας. Οικονομικές αναλύσεις δείχνουν ότι το οικονομικό όφελος που προκύπτει στον Τομέα της Υγείας από τη μείωση των ασθματικών παροξυσμών είναι μεγαλύτερο από το κόστος εφαρμογής της εξέτασης.³⁵ Η πρόκληση πτυέλων είναι σχετικά χρονοβόρα διαδικασία και η επεξεργασία τους απαιτεί εργαστηριακή υποστήριξη. Όμως, ο εξοπλισμός που χρειάζεται υπάρχει σχεδόν σε όλα τα παθολογοανατομικά εργαστήρια και η εκπαίδευση που απαιτείται είναι ελάχιστη. Για το λόγο αυτό η εξέταση αυτή θα πρέπει να είναι διαθέσιμη τουλάχιστον σε τριτοβάθμια νοσοκομεία και να εφαρμόζεται στην τακτική παρακολούθηση ασθενών με σοβαρό άσθμα ως οδηγός στις θεραπευτικές αποφάσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-29.
2. Report of working group 1. Sputum induction. *Eur Resp J* 2002; 20 (Suppl 37): 3s-8s.
3. Twaddell SH, Gibson PG, Carty K, Wooley KL, Henry RL. Assessment of airways inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996; 9: 2140-2148.

4. Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, et al. Sputum induction in children with difficult asthma. Safety, feasibility and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 318-324.
5. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave FE. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; 8: 559-565.
6. Li AM, Tsang TW, Chan DF, Lam HS, So HK, Sung RY, et al. Sputum induction in children with asthma: a tertiary -center experience. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 720-725.
7. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. 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.
8. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1126-1131.
9. Efthimiadis A, Pizzichini MM, Kolendowicz R, Weston S, Dolovich J, Hargreave FE. The influence of cell viability and squamous epithelial cell contamination on the reliability of sputum differential cell counts. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: A384.
10. Spanevello A, Beghe B, Bianchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M, et al. Comparison of two methods of processing induced sputum: selected versus entire sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 665-668.
11. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996; 9: 1174-1180.
12. Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998; 11: 848-853.
13. Gibson PG, Norzila MZ, Fakes K, Simpson J, Henry RL. Pattern of airway inflammation and its determinants in children with acute severe asthma. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28: 261-270.
14. Report of working group 4. Analysis of fluid-phase mediators. *Eur Respir J* 2002; 20 (Suppl 37): 24s-39s.
15. Louis R, Shute J, Goldring K, Perks B, Lau LC, Radermecker M, Djukanovic R. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur Respir J* 1999; 13: 660-667.
16. Kelly MM, Evans S, Leigh R, Efthimiadis A, Gleich GJ, Horsewood P, and Hargreave FE. Recovery of radiolabelled interleukin-5 (IL-5) from sputum fluid phase differs when estimated by gamma counter or immunoassay. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: A849.
17. Kelly MM, Evans S, Leigh R, Efthimiadis A, Gleich GJ, Horsewood P, and Hargreave FE. Assayed levels of interleukin-5 (IL-5) in the fluid phase of induced sputum may be increased by protease-inhibitors. *Eur Respir J* 1999; 14: 166S.
18. Grootendorst DC, van den Bos J-W, Romeijn JJ, Veselic-Charvat M, Duiverman EJ, Vrijlandt EJ, et al. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophilic cationic protein to clinical severity. *Eur Respir J* 1999; 13: 647-653.
19. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003; 58: 116-121.
20. Ryttilä P, Pelkonen AS, Metso T, Nikander K, Haantela T, Turpeinen M. Induced sputum in children with newly diagnosed mild asthma. The effect of 6 months of treatment with budesonide or disodium cromoglycate. *Allergy* 2004; 59: 839-44.
21. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57: 643-648.
22. Payne DNR, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1376-1381.
23. Petsky HL, Kynaston JA, Turner C, Li AM, Cates CJ, Lasserone TJ, et al. Tailored interventions based

- on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults. Review. Cochrane Library 2007, Issue 4.
24. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1077-1082.
 25. Fleming L, Wilson N, Bush A. Difficult to control asthma in children. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 190-195.
 26. Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I. Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 224-232.
 27. Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, Kapsner RK, Osberg I, Accurso FJ. Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2002; 141: 811-817.
 28. Kim JS, Okamoto K, Rubin BK. Pulmonary function is negatively correlated with sputum inflammatory markers and cough clearability in subjects with cystic fibrosis but not those with chronic bronchitis. *Chest* 2006; 129: 1148-1154.
 29. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, et al. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 822-828.
 30. Salva PS, Doyle NA, Graham L, Eigen H, Doerschuk CM. TNF-alpha, IL-8, soluble ICAM-1, and neutrophils in sputum of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 11-19.
 31. Pukhalsky AL, Kapranov NI, Kalashnikova EA, Shmarina GV, Shabalova LA, Kokarovtseva SN, et al. Inflammatory markers in cystic fibrosis patients with lung *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mediators Inflamm* 1999; 8: 159-167.
 32. Fireman E, Lerman Y. Possible future of induced sputum in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2000; 15: 240-242.
 33. Simpson JL, Moric I, Wark PA, Johnston SL, Gibson PG. Use of induced sputum for the diagnosis of influenza and infections in asthma: a comparison of diagnostic techniques. *J Clin Virol* 2003; 26: 339-346.
 34. Zar HL, Hanslo D, Apolles P, Swingle G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet* 2005; 365: 130-134.
 35. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 1715-1721.

Καλλιέργεια Πτυέλων

Μ. Κανελλοπούλου, Ο. Ζαφειριάδου

Πτύελο είναι το φλεγμονώδες εξίδρωμα των βρόγχων και κυψελίδων, που παράγεται μετά από προσβολή του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος από παθογόνους μικροοργανισμούς. Συνήθως πρόκειται για ιούς, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* και *Moraxella catarrhalis*. Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί το κλασικό παθογόνο των ασθενών με κυστική ίνωση (ΚΙ), ενώ νεότερα παθογόνα όπως *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex, *Nocardia* spp, *Achromobacter xylosoxidans* απομονώνονται ως χρόνιοι αποικιστές, που εμπλέκονται στη χρόνια φλεγμονή του αναπνευστικού αυτών των ασθενών.

Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Εταιρεία Θώρακος (American Thoracic Society, ATS), την Αμερικάνικη Εταιρεία Λοιμώξεων (Infectious Diseases Society of America, IDSA) και τη Καναδική Εταιρεία Λοιμώξεων (Canadian Infectious Disease Society, CIDS), η καλλιέργεια των πτυέλων ως εξέταση αναζήτησης του παθογόνου αιτίου της πνευμονίας της κοινότητας είναι περιορισμένης αξίας λόγω πρόσμιξης κατά την απόχρεμψη με μικρόβια της φυσιολογικής χλωρίδας του στοματοφάρυγγα.¹ Από πολλές επιστημονικές εταιρείες η καλλιέργεια αίματος προτείνεται ως βασική διαγνωστική προσέγγιση της πνευμονίας. Ωστόσο, θετική αποβαίνει στο 8-10% της πνευμονίας της κοινότητας, ενώ από αυτό, το 60% οφείλεται στον *S. pneumoniae*.² Η ευαισθησία της καλλιέργειας των πτυέλων είναι <50%, γεγονός που οφείλεται στο χαμηλό ποσοστό απομόνωσης του *S. pneumoniae*, ιδιαίτερα όταν το δείγμα δεν αποσταλεί άμεσα στο εργαστήριο και καθυστερήσει η επεξεργασία του.¹ Επίσης, η καλλιέργεια των πτυέλων αποτελεί ακατάλληλο δείγμα για τη διάγνωση της πνευμονίας του αναπνευστήρα.

ΣΥΛΛΟΓΗ

Αυτόματη απόχρεμψη

Από μικρά παιδιά που δεν συνεργάζονται

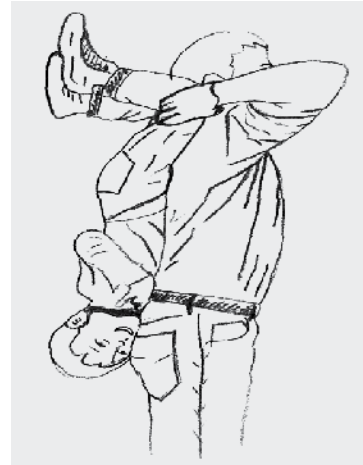
Η συλλογή του δείγματος των πτυέλων από παιδιά είναι ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία, απαιτεί υπομονή και επιμονή τόσο από τον παιδίατρο όσο



Εικόνα 1. Τραμπολινό για κινητοποίηση εκκρίσεων.

και από τους γονείς. Η βοήθεια των φυσικοθεραπευτών πολλές φορές είναι απαραίτητη και συνίσταται: α) στην πρόκληση κατευθυνόμενου βήχα, β) στην κινητοποίηση των εκκρίσεων - πρόκληση βήχα και γ) στη βρογχική παροχέτευση.^{3,4}

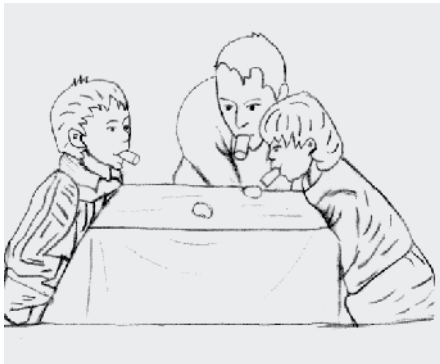
Πρόκληση κατευθυνόμενου βήχα: Με το βήχα διευκολύνεται η προσδευτική μεταφορά των εκκρίσεων από τους μικρούς στους μεσαίους βρόγχους, εν συνεχεία στους μεγάλους, στο λάρυγγα και τέλος η αποβολή τους από τη στοματική κοιλότητα. Στα παιδιά ηλικίας μικρότερης των 18 μηνών προκαλείται βήχας με εφαρμογή ελαφράς πίεσης με το δάκτυλο στην τραχεία κάτω από τον κρικοθυρεοειδή χόνδρο. Η τεχνική αυτή πρέπει να γίνεται με προσοχή, διότι είναι δυνατό να προκληθεί βραδυκαρδία. Τα παιδιά ηλικίας 1-2 ετών συχνά βήχουν όταν τους ζητηθεί μιμούμενα κάποιον ενήλικο, είναι δύσκολο όμως κάτι τέτοιο να γίνει, όταν είναι άρρωστα.³



Εικόνα 2. «Upside down piggy back»
Θέση για κινητοποίηση εκκρίσεων.

Κινητοποίηση των εκκρίσεων γίνεται:

- Με χειρισμούς δονήσεων και επίκρουσης, οι οποίοι διευκολύνουν στην αποκόλληση των εκκρίσεων από τα βρογχικά τοιχώματα. Είναι αποτελεσματικοί μόνο όταν ο αναπνευστικός ρυθμός είναι φυσιολογικός ή σχεδόν φυσιολογικός (30-40 αναπνοές/min). Εάν τα παιδιά αναπνέουν πολύ γρήγορα (>60 αναπνοές/min), οι δονήσεις δεν αποδίδουν, διότι η φάση εκπνοής είναι πολύ μικρή.
- Με ορισμένα παιχνίδια όπως το τραμπολίνο, το κράτημα του παιδιού από τα πόδια στην πλάτη του γονιού με το κεφάλι κρεμασμένο κάτω «upside down piggy back», το φύσημα κομματιών βαμβακιού ή υφάσματος με τη βοήθεια σωλήνος «huffing games» (Εικόνες 1-3).
- Με γαργαλήτο.



Εικόνα 3. Huffing games για κινητοποίηση εκκρίσεων.

Με τις παραπάνω τεχνικές εκπαιδεύονται οι μικροί ασθενείς από την ηλικία των τριών ετών να αποχρέμπουν και να δίνουν δείγματα πτυέλων για καλλιέργεια, ιδιαίτερα εάν πάσχουν από χρόνια πρόβλημα, όπως ΚΙ και βρογχεκτασίες.^{3,4}

Βρογχική παροχέτευση: συχνά πραγματοποιείται παράλληλα με τις παραπάνω τεχνικές. Τοποθετείται το παιδί σε κατάλληλες θέσεις, οπότε οι εκκρίσεις μετακινούμενες προκαλούν το αντανάκλαστικό του βήχα.

Από παιδιά που συνεργάζονται

Προκειμένου να δοθεί σωστό δείγμα πτυέλων συνιστώνται οι εξής οδηγίες:⁵

- Ξεπλένεται το στόμα με αποστειρωμένο νερό ή φυσιολογικό ορό. Αποφεύγεται η χρήση νερού βρύσης, διότι είναι δυνατόν να υπάρχουν άτυπα μυκοβακτηρίδια ή *Legionella*

spp. στο νερό και να δημιουργήσουν πρόβλημα στην αξιολόγηση του αποτελέσματος, ιδιαίτερα σε περίπτωση που υπάρχει υποψία φυματίωσης ή νόσου των λεγεωναρίων.

- Δίνονται τα πτύελα με βαθιά απόχρεμψη. Σε αυτό βοηθά αρκετά και η τεχνική των βαθιών αναπνοών “deep breaths”, ή η εντολή να γεμίσει ο θώρακας με αέρα «σα μπαλόني» και να ακολουθήσει εκπνοή. Καταλληλότερο δείγμα είναι το πρωινό, πριν από το πρόγευμα.
- Τα πτύελα συλλέγονται σε ευρύστομο δοχείο το οποίο κλείνει πολύ καλά, ακολουθεί η σήμανση με το όνομα του μικρού ασθενή και μεταφέρονται στο εργαστήριο σε λιγότερο από μια ώρα.

Σίαλος ή ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις αποτελούν ακατάλληλα δείγματα για καλλιέργεια και απομόνωση κοινών μικροβίων. Ομοίως, δεν είναι αποδεκτό για καλλιέργεια το δείγμα συλλογής πτυέλων 24ώρου, καθώς και η απαίτηση για απομόνωση αναεροβίων μικροβίων.¹

Επαγώγιμα ή προκλητά πτύελα

Η λήψη επαγώγιμων πτυέλων (induced sputa) αποτελεί μη επεμβατική εναλλακτική λύση συλλογής δείγματος κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Η μέθοδος έχει δοκιμαστεί με επιτυχία και ασφάλεια στους μικρούς ασθενείς με ΚΙ, στους οποίους το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) αποτελεί δυσάρεστη εμπειρία και επεμβατική τεχνική. Σημειώνεται ότι, παρά τη δυνατότητα παραγωγής αυτόματου ή προκλητού βήχα, υψηλό ποσοστό (περίπου 45%) ασθενών με ΚΙ, ιδιαίτερα μικρότερης ηλικίας, αδυνατεί να αποχρέμψει.⁶ Τα πτύελα που λαμβάνονται μετά από εισπνοή υπέρτονου διαλύματος NaCl 6% με τη βοήθεια νεφελοποιητή, συλλέγονται σε ευρύστομο δοχείο, το οποίο κλείνει καλά προς αποφυγή διασποράς παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη μεταφορά τους προς το εργαστήριο. Προηγείται σχολαστικός καθαρισμός της στοματικής κοιλότητας (παρειές, γλώσσα, ούλα) με στείρο φυσιολογικό ορό και οδοντόβουρτσα για 5–10 min χωρίς τη χρήση οδοντόκρεμας.¹ Έχει αποδειχθεί, ότι το δείγμα των επαγώγιμων πτυέλων δίνει επιπλέον μικροβιολογικές πληροφορίες, οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη θεραπευτική αγωγή των ασθενών και υπερέχει ακόμη και του γαστρικού εκπλύματος (lavage) για τη διάγνωση της πνευμονικής φυματίωσης.⁷⁻⁹

Φαρυγγικό δείγμα μετά από πρόκληση βήχα

Σε ασθενείς με ΚΙ μικρής ηλικίας (<10 ετών), προκειμένου να ληφθεί έκκριμα από το κατώτερο αναπνευστικό, δοκιμάζεται η λήψη δείγματος μετά από πρόκληση βήχα (cough or gagged specimen):¹

- τοποθετείται στυλεός με Dacron ή rayon στο πίσω μέρος του φάρυγγα και προκαλείται βήχας (cough swab).
- Όταν γίνει η συλλογή των εκκρίσεων, απομακρύνεται ο στυλεός.
- Τοποθετείται σε υλικό μεταφοράς και αποστέλλεται στο Εργαστήριο.
- Έχει αποδειχτεί ότι το δείγμα μετά από πρόκληση βήχα έχει υψηλή θετική προγνωστική αξία, ένα αρνητικό όμως αποτέλεσμα δεν αποκλείει την παρουσία παθογόνων μικροβίων στο κατώτερο αναπνευστικό των ασθενών με ΚΙ.¹⁰ Εναλλακτικά έχει χρησιμοποιηθεί τρυβλίο αντί στυλεού, πάνω στο οποίο έχει ζητηθεί από τον ασθενή να βήξει δύο φορές (cough plate). Η ευαισθησία της τελευταίας μεθόδου, σύμφωνα με τους ερευνητές, φθάνει στο 80% σε σχέση με την κλασική καλλιέργεια των πτυέλων, υπερέχει του δείγματος μετά από πρόκληση βήχα, ενώ μελετάται η δυνατότητα εφαρμογής

αυτής της τεχνικής σε ασθενείς με ΚΙ που δεν αποχρέμτουν εύκολα, χρησιμοποιώντας περισσότερα τρυβλία, ή τρυβλία με διαφορετικά θρεπτικά υλικά.¹¹

Προ το παρόν, συνιστάται να αποφεύγεται αυτή η τεχνική, όταν το παιδί συνεργάζεται και είναι σε θέση να δώσει δείγμα πτυέλων όπως περιγράφηκε πιο πάνω.¹

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Το δείγμα πτυέλων ασθενών χωρίς ΚΙ πρέπει να μεταφερθεί και η επεξεργασία του να γίνει άμεσα στο εργαστήριο (εντός μιας ώρας).¹ Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η συντήρηση των πτυέλων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κοινών παθογόνων,¹² άποψη που διαφέρει από τις θέσεις της κλασικής βιβλιογραφίας, αλλά και από την εμπειρία των συγγραφέων στη διαχείριση τέτοιων δειγμάτων.¹

Η μεταφορά και επεξεργασία του δείγματος ασθενών με ΚΙ πρέπει να γίνεται εντός 4 ωρών. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, διατηρείται στους 4°C για 24 ώρες, χωρίς να επηρεάζεται η απομόνωση των παθογόνων που ενδιαφέρουν επί ΚΙ. Απαραίτητη είναι η ένδειξη ότι πρόκειται για δείγμα ασθενούς με ΚΙ, διότι η επεξεργασία στο εργαστήριο είναι διαφορετική και απαιτεί χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών για την απομόνωση νεότερων παθογόνων.¹

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ – ΑΠΟΔΟΧΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Σε μικροσκοπικό νωπό ή ξηρό παρασκεύασμα εκτιμάται η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων. Σύμφωνα με τους Murrey και Washington αποδεκτά για καλλιέργεια είναι τα δείγματα με πυοσφαίρια >25 κ.ο.π. σε ξηρά παρασκευάσματα χρωματισμένα με χρώση Gram.¹³ Η αξιολόγηση γίνεται με φακούς χαμηλής μεγέθυνσης (low power, 10×10 προσοφθάλμιος × αντικειμενικός) μετά από μικροσκόπηση 20-40 οπτικών πεδίων. Γενικά απορρίπτονται δείγματα με >25 επιθήλια κ.ο.π.

Σήμερα επικρατεί η άποψη ότι το δείγμα που πρέπει να καλλιεργείται είναι εκείνο που τα πυοσφαίρια είναι 10πλάσια των επιθηλιακών κυττάρων κατά οπτικό πεδίο και υπερέχει σημαντικά ένας μικροβιακός πληθυσμός. Η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού γίνεται με καταδυτικό φακό (×100). Η ευαισθησία και η ειδικότητα της χρώσης Gram ποικίλει, εξαρτώμενη από την εμπειρία του εξεταστή αλλά και από το είδος του δείγματος.^{2,14,15} Γενικά τα παρασκευάσματα είναι αξιόπιστα –πάντως όχι αλάνθαστα– μόνον εφόσον υπάρχουν άφθονα φλεγμονώδη κύτταρα και επικρατούν Gram θετικοί διπλόκοκκοι (57% ευαισθησία για *S. pneumoniae*), ή Gram αρνητικά βακτήρια με πολυμορφία (82% ευαισθησία για *H. influenzae*).^{15,16} Η χρώση Gram μετά από επεξεργασία των πτυέλων με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση της χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού (washed sputum) έχει ευαισθησία για τον *H. influenzae*, τον *S. pneumoniae* και τη *M. catarrhalis* 86%, 81%, 91% και ειδικότητα 95%, 97%, 98% αντίστοιχα, συγκρινόμενη με την καλλιέργεια, ενδείκνυται για παιδιατρικά δείγματα, όμως είναι δύσκολη στην καθημερινή πρακτική.¹⁷ Τα δείγματα από ασθενείς με ΚΙ, ουδετεροπενία και υποψία λοίμωξης από *L. pneumophila*, καλλιεργούνται χωρίς την απαραίτητη προϋπόθεση της παρουσίας των φλεγμονωδών κυττάρων.¹⁸

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΙΑ ΚΟΙΝΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Ημιποσοτική

Τα δείγματα των πτυέλων (επιλέγεται το πλέον πυώδες ή αιματηρό τμήμα) ενοφθαλμίζονται σε αιματούχο άγαρ που επωάζεται στους 35 °C σε αερόβιες συνθήκες για 48-72 ώρες, σε σοκολατόχρωμο άγαρ με βακιτρακίνη 20.000 IU/L ή δισκίο βακιτρακίνης των 10 IU, που επωάζεται στους 35 °C σε ατμόσφαιρα CO₂ για 24-48 ώρες και σε MacConkey άγαρ που επωάζεται σε αερόβιες συνθήκες για 48 ώρες για την απομόνωση Gram αρνητικών βακτηρίων.¹

Ποσοτική

Τα πτύελα ομογενοποιούνται με ίση ποσότητα sputolysin, ανακινούνται σε vortex και παραμένουν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια 10 µL από το ομογενοποιημένο δείγμα αραιώνεται (1:100) σε Ringer's Lactade ή σε Brain Heart Infusion – Hemin-Isovitalex Albumin (BHI – HIA) ζωμό και ενοφθαλμίζονται τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, όπως παραπάνω.¹⁹ Σε δείγματα πτυέλων ασθενών με ΚΙ επιβάλλεται η χρήση ειδικών θρεπτικών υλικών, όπως Mannitol Salt Agar για την απομόνωση *S. aureus* ιδιαίτερα του φαινοτύπου των μικρών αποικιών (Small Colony Variant phenotype, SCV) και ειδικού υλικού με πολυμυξίνη Β (colistin) για την απομόνωση των μικροοργανισμών του συμπλέγματος *Burkholderia cepacia*. Μετά την επώαση γίνεται καταμέτρηση των αποικιών και υπολογίζεται ο αριθμός σε colony forming units (cfu/ml) λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση που έχει προηγηθεί. Η ταυτοποίηση των μικροβίων γίνεται με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους και το αντιβιογράμμα σύμφωνα με τις οδηγίες της CLSI.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ – ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΚΟΙΝΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

1. Εάν αναπτυχθούν μικρόβια της χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος η απάντηση δίδεται ως εξής: «Αναπτύχθηκε χλωρίδα ανώτερου αναπνευστικού συστήματος».
2. Θετική καλλιέργεια για *S. pneumoniae* και *H. influenzae* είναι ενδεικτική λοίμωξης, ενδέχεται όμως να γίνει υπεραξιολόγηση, διότι οι παραπάνω μικροοργανισμοί ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα.
3. Ανάπτυξη κλασικών παθογόνων μικροοργανισμών από το δεύτερο τεταρτημόριο του τρυβλίου αξιολογείται σε σχέση με τη μικροσκοπική χρώση Gram.
4. Απομόνωση Gram αρνητικού βακτηρίου ή *S. aureus* σε συνεκτίμηση με τη χρώση Gram δηλώνει λοίμωξη από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς.
5. Ανάπτυξη μικρού αριθμού αποικιών στο πρώτο τεταρτημόριο του τρυβλίου χωρίς ανάπτυξη φυσιολογικής χλωρίδας (μονοκαλλιέργεια), αξιολογείται παράλληλα με την παρουσία πυοσφαιρίων στο μικροσκοπικό κατά Gram παρασκεύασμα.
6. Αριθμός $\geq 10^5$ cfu/ml στην ποσοτική καλλιέργεια είναι ενδεικτικός για λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.
7. Αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει τη λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Η αιμοκαλλιέργεια, οι ορολογικές δοκιμασίες, η αναζήτηση αντιγόνων *S. pneumoniae* και *L. pneumophila* serogroup 1 στα ούρα, ακόμη και μοριακές τεχνικές, ιδιαίτερα η PCR πραγματικού χρόνου βοηθούν στην αιτιολογική διάγνωση της πνευμονίας. Η εφαρμογή της τελευταίας τεχνικής επιταχύνει τη διάγνωση, με αποτέλεσμα την έγκαιρη έναρξη της κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας, τη μείωση του χρόνου νοσηλείας και τέλος την αποφυγή νοσοκομειακών λοιμώξεων.¹⁹

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΙΑ ΕΙΔΙΚΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Mycobacterium tuberculosis

Η διάγνωση της παιδικής φυματίωσης βασίζεται στο ιστορικό (αναφερόμενη επαφή με ενήλικο ασθενή) στην κλινική εικόνα, στην ακτινογραφία θώρακα, στην δερμοαντίδραση mantoux και στο θετικό για οξείαντοχα μικρόβια πλακάκι / θετική καλλιέργεια, τα οποία δυνατόν να είναι αρνητικά. Η απομόνωση *M. tuberculosis* στην καλλιέργεια επιβεβαιώνει βακτηριολογικά τη νόσο και επιπλέον λόγω της πιθανότητας ανθεκτικών στελεχών δίνει τη δυνατότητα ελέγχου ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα.²⁰

Non-tuberculus Mycobacteria

Απαραίτητη θεωρείται πλέον η καλλιέργεια των πτυέλων για *Non-tuberculus Mycobacterial species* (NTM) σε ασθενείς με ΚΙ. Η επίπτωση των NTM στους συγκεκριμένους ασθενείς στις Η.Π.Α κυμαίνεται από 7-24% σύμφωνα με πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη, με επικράτηση των *M. avium* complex, MAC (72%).²¹ Στην Ευρώπη και συγκεκριμένα σε Γάλλους ασθενείς μέσης ηλικίας 12 ($\pm 6,1$) ετών, η επίπτωση των NTM βρέθηκε 8,1% με επικράτηση του *Mycobacterium abscessus* (14%). Η επεξεργασία των πτυέλων γίνεται με NALC-NaOH-oxalic acid (0,25% N-acetyl-L-cysteine-1% sodium hydroxide- 5% oxalic acid) για απομάκρυνση της *P. aeruginosa*, ενοφθαλμίζονται σε Lowenstein-Jensen και η ταυτοποίηση γίνεται με μοριακές τεχνικές (Accuprobe technique).²²

Legionella spp.

Προηγείται η απομάκρυνση της φυσιολογικής χλωρίδας και των Gram αρνητικών βακτηρίων, εάν υπάρχουν, με όξινο διάλυμα KCL pH 2,2 ως εξής: 0,1 ml πτυέλων τοποθετούνται σε 0,9 ml KCL, ανακινούνται και παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εμβολιάζονται θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με ουσίες απαραίτητες για την ανάπτυξη του μικροβίου, όπως ferric pyrophosphate, cysteine, α -ketoglutarate & charcoal και επωάζονται στους 35 °C για 10 ημέρες.¹ Η αναζήτηση του αντιγόνου της *Legionella* στα ούρα με ανοσοχρωματογραφία μεμβράνης δίνει το αποτέλεσμα εντός 15 min, καλύπτει όμως μόνο την οροομάδα 1 και έτσι το αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει τη λοίμωξη από άλλη οροομάδα ή άλλο είδος *Legionella*.²³

Συμπερασματικά η καλλιέργεια των πτυέλων αποτελεί «εύκολο» δείγμα για τη διάγνωση της πνευμονίας της κοινότητας, δεν είναι όμως η εξέταση που θα αποκαλύψει με βεβαιότητα τον υπεύθυνο μικροβιακό παράγοντα. Σε χρόνιες λοιμώξεις (ΚΙ, βρογχεκτασίες) απαιτείται στενή συνεργασία παιδίατρου, φυσικοθεραπευτών και γονέων για την εκπαίδευση του παιδιού ώστε να δώσει πτύελα με βαθειά απόχρεμψη. Η απομόνωση κοινών παθογόνων μικροβίων αξιολογείται πάντα σε σχέση με τη μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων (χρώση Gram), ενώ η κλινική εικόνα και το ιστορικό του ασθενούς επιβάλλει τη χρήση ειδικών θρεπτικών υλικών για την απομόνωση ειδικών ή νέων παθογόνων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. York MK, Gilligan P. Lower Respiratory Tract cultures. In: H.D. Isenberg (Editor-in-Chief), Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2004. p. 3.11.2.1-3.11.2.15.
2. Mandell LA, Marrie TJ, Grossman RF, Chow AW, Hyland RH, and the Canadian Community-Acquired Pneumonia Working Group. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. Clin Infect Dis 2000; 31: 383-421.
3. Hough A. Physiotherapy for Children and Infants. In: Physiotherapy in Respiratory Care. 2nd Edition, London: Chapman and Hall; 1996. p. 286-302.
4. Pryor JA, Webber BA, eds. Physiotherapy for respiratory and cardiac problems: Churchill Livingstone; 1993. p. 281-318.
5. Παπαφράγκας Ε, Κανελλοπούλου Μ, Βογιατζάκης Ε, Μαργαρίτη Γ. Αναπνευστικό σύστημα. Οδηγός Λήψης και Μεταφοράς Κλινικών Δειγμάτων Στην Εργαστηριακή Διάγνωση των Λοιμώξεων. Αθήνα: Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία; 2001.
6. Radhakrishnan DK, Corey M, Dell SD. Realities of expectorated sputum collection in the pediatric cystic fibrosis clinic. Arch Pediatr Adolesc Med 2007; 161: 603-606.
7. Boeck K, Alifier M, Vandeputte S. Sputum induction in young cystic fibrosis patients. Eur Respir J 2000; 16: 91-94.
8. Ho SA, Ball R, Morrison LJ, Brownlee KG, Conway SP. Clinical value of obtaining sputum and cough swab samples following inhaled hypertonic saline in children with cystic fibrosis. Pediatric Pulmonol 2004; 38: 82-87.
9. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swingle G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. Lancet 2005; 365: 130-134.
10. Equi AC, Pike SE, Davies J, Bush A. Use of cough swabs in cystic fibrosis clinic. Arch Dis Child 2001; 85: 438-439.
11. Maiya S, Desai M, Baruah A, Weller P, Clarke JR, Gray J. Cough plate versus cough swab in patients with cystic fibrosis; a pilot study. Arch Dis Child 2004; 89: 577-579.
12. Pye A, Hill SL, Bharadwa P, Stockley R. Effect of storage and postage on recovery and quantitation of bacteria in sputum samples. J Clin Pathol 2008; 61: 352-354.
13. Murrey PR, Washington JA II. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. Mayo Clin Proc 1975; 50: 339-344.
14. Nagendra S, Bourbeau P, Brecher S, Dunne M, LaRocco M, Doern G. Sampling variability in the microbiological evaluation of expectorated sputa and endotracheal aspirates. J Clin Microbiol 2001; 39: 2344-2347.
15. Roson B, Carratalà J, Verdager R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Prospective study of the usefulness of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Clin Infect Dis 2000; 31: 869-874.
16. Gleckman R, DeVita J, Hibert D, Pelletier C, Martin R. Sputum gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia. J Clin Microbiol. 1988; 26: 846-849.
17. Dong CL, Naruhiko I, Nobue T, Yukito N, Jirou A, Haruo K, et al. Value of washed sputum gram stain smear and culture for management of lower respiratory tract infections in children. J Infect Chemother 2004; 10: 31-36.
18. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Infections of the lower Respiratory Tract. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St Louis: Mosby Inc; 2002. p. 884-898.
19. Kais M, Spindler C, Kalin M, Ortqvist A, Giske CG. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55: 169 -178.

20. Schaaf HS, Vermeulen HA, Gie RP, Beyers N, Donald PR. Evaluation of young children in household contact with adult multidrug-resistant pulmonary tuberculosis cases. *Pediatr Infect Dis* 1999; 18: 494-500.
21. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, et al. Nontuberculous Mycobacteria. Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 828-834.
22. Pierre-Audigier C, Ferroni A, Sermet-Caudelus I, Le Bourgeois M, Offredo C, Vu-Thien H, et al. Age related prevalence and distribution of Nontuberculous Mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3467-3470.
23. Κανελλοπούλου Μ, Παρασκευόπουλος Ι, Δημητρούλια Ε, Κατωπόδη Μ, Βασιλάκης Ν, Λαμπρόπουλος Σ, και συν. Πνευμονία κοινότητας από *Legionella pneumophila* οροομάδας 1. *Αρχ Ελλ Ιατρ* 2001; 18: 393-396.

Καλλιέργεια βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος

Α. Μακρή, Α. Βογιατζή

Δείγματα για τη διάγνωση λοίμωξης του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με καλλιέργεια βιολογικού υλικού από το βρογχοκυψελιδικό δένδρο λαμβάνονται με επεμβατικές και μη επεμβατικές τεχνικές. Οι τρόποι συλλογής των δειγμάτων με επεμβατικές τεχνικές είναι η διατραχειακή αναρρόφηση, η βρογχοσκόπηση, η διαθωρακική αναρρόφηση πνεύμονα με βελόνη, η ανοικτή βιοψία πνεύμονα και η θωρακοσκοπική βιοψία πνεύμονα.^{1,2}

Μετά την εισαγωγή του εύκαμπτου βρογχοσκοπίου (εύκαμπτου ινιοσκοπικού βρογχοσκοπίου, Flexible Fiberoptic Bronchoscope, FFB) από τον Ikeda (1970), η χρήση του έτυχε ευρείας πρακτικής εφαρμογής και παράλληλα η λήψη δειγμάτων διαμέσου αυτού.^{1,3} Τα είδη των δειγμάτων είναι το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) και το υλικό προστατευμένης βρογχικής βούρτσας (PSB).¹⁻³ Η λήψη BAL σύντομα αναδείχτηκε σε σημαντικό εργαλείο της κλινικής και εργαστηριακής διαγνωστικής των πνευμονικών λοιμώξεων. Έχει αναγνωρισθεί η συμβολή του στη διάγνωση των ευκαιριακών και ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, των λοιμώξεων της κοινότητας και έχει προσφέρει νέα δεδομένα στη μελέτη της παθογένειας πνευμονικών νοσημάτων.

Το Μικροβιολογικό Εργαστήριο επιμελείται με ιδιαίτερη προσοχή και μέριμνα την επεξεργασία των δειγμάτων που λαμβάνονται με τις επεμβατικές τεχνικές (BAL, PSB), τα οποία είναι πολύτιμα και αναντικατάστατα.²

ΒΡΟΓΧΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

Τεχνική συλλογής

Το BAL είναι τεχνική που επιτρέπει την απομόνωση κυτταρικών και βιοχημικών στοιχείων από την επιφάνεια του επιθηλίου των μικρών αεροφόρων οδών του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, ιδιαίτερα των κυψελίδων. Διαφέρει από τα βρογχικά εκπλύματα που λαμβάνονται με την αναρρόφηση εκκρίσεων ή μικρής ποσότητας εγχυθέντος φυσιολογικού ορού από τους μεγάλους αεραγωγούς.

Η λήψη σε παιδιά μικρότερα των 8-9 ετών εκτελείται με FFB εξωτερικής διαμέτρου 3,5-3,7 mm, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας 4,6-4,9 mm, με γενική αναισθησία με αυτόματη αναπνοή. Τα δείγματα συνήθως λαμβάνεται από τον μέσο λοβό ή τη γλωσσίδα, εκτός εάν υπάρχει εστιακή βλάβη σε άλλο τμήμα του βρογχικού δένδρου. Το FFB κατευθύνεται σε τμηματικό ή υπο-τμηματικό βρόγχο του υπό εξέταση λοβού και προωθείται μέχρις ότου ενσφηνωθεί πλήρως. Στα βρέφη είναι ευκολότερη η εφαρμογή BAL στο δεξιό κάτω λοβό.

Εκπλύνονται οι κατώτερες αεροφόροι οδοί σταδιακά με δόσεις φυσιολογικού διαλύ-

ματος NaCl προθερμασμένου σε θερμοκρασία 37 °C. Το έκπλυμα αναρροφάται με χαμηλή πίεση (<100 Torr) για την αποφυγή σύμπτωσης και τραυματισμού των τοιχωμάτων του βρόγχου. Το αιμορραγικό υλικό μπορεί να μειώσει την διαγνωστική αξία της εξέτασης και να επηρεάσει την συγκέντρωση των κυτταρικών και πρωτεϊνικών στοιχείων. Για την λήψη εκπλύματος σε παιδιά βάρους <20 kg, ο όγκος του χορηγούμενου φυσιολογικού ορού υπολογίζεται ανάλογα με το σωματικό βάρος (3 ml/Kg^{-1}) διαιρεμένος σε τρία ίσα κλάσματα. Το λαμβανόμενο υλικό θεωρείται αποδεκτό εφόσον έχουμε επιστροφή >40% της συνολικής ποσότητας που εγχύθηκε. Επιδιώκεται να αναρροφάται το 40-60% για εξασφάλιση της βιωσιμότητας των κυτταρικών στοιχείων σε ποσοστό >80%. Η μικρή ηλικία αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει αρνητικά το ποσοστό του αναρροφούμενου υγρού.^{1,4-6}

Το BAL που λαμβάνεται μετά από κάθε έγχυση συλλέγεται ξεχωριστά σε αποστειρωμένα δοχεία (συνήθως γυάλινα σωληνάρια επιστρωμένα με σιλικόνη), στα οποία σημειώνεται η θέση λήψης του δείγματος και ο συνολικός του όγκος. Το πρώτο δείγμα θεωρείται περισσότερο βρογχικής προελεύσεως και χρησιμοποιείται για τις μικροβιολογικές εξετάσεις, τα επόμενα δύο προορίζονται για κυτταρολογική ή όποια άλλη εξέταση χρειασθεί. Στα συνοδευτικά παραπεμπτικά είναι απαραίτητο να αναγράφεται ο χρόνος λήψης, το ιστορικό, τα εργαστηριακά και ακτινολογικά δεδομένα και η προηγηθείσα αντιμικροβιακή αγωγή, για την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.^{3,4}

Τα προβλήματα που προκύπτουν κατά την εφαρμογή της τεχνικής BAL είναι συνήθως τα εξής:

- Οι εκκρίσεις που συλλέγονται από τους αεραγωγούς είναι βλεννώδεις.
- Το βρογχοσκόπιο ενσφηνώνεται σε ακατάλληλη θέση.
- Ο όγκος συλλογής είναι <40% του εγχυθέντος υγρού.
- Τα επιθηλιακά κύτταρα υπερβαίνουν το 1% των συνολικών κυττάρων (κακή βρογχοσκοπική τεχνική).
- Τα δείγματα επιμολύνονται από το ανώτερο αναπνευστικό.
- Η καθυστέρηση διακίνησης και επεξεργασίας των δειγμάτων BAL για χρονικό διάστημα πέρα των >2h και σε συνθήκες μη ψύξης, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια απαιτητικών μικροοργανισμών (*Streptococcus pneumoniae*) και την υπερανάπτυξη Gram αρνητικών βακτηρίων (*Enterobacteriaceae*). Η καθυστέρηση της μεταφοράς πρέπει να επισημαίνεται στην απάντηση της καλλιέργειας, δεδομένου ότι μειώνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.^{4,7}

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Ένδειξη εφαρμογής BAL στα παιδιά για καλλιέργεια αποτελούν οι παρακάτω κλινικές καταστάσεις. Σε παρένθεση αναφέρονται οι λοιμογόντοι παράγοντες που συγκεντρώνουν ειδικότερο ενδιαφέρον ανά περίπτωση:⁷

- Ενδονοσοκομειακή πνευμονία: πνευμονία του αναπνευστήρα (VAP), πνευμονία από εισρόφηση,
- Κυστική ίνωση (*Burkholderia cepacia* complex, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*),
- Μυκοβακτηριδιακές λοιμώξεις (*M. tuberculosis* – πρωτοπαθές σύμπλεγμα της παιδικής ηλικίας, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*),
- Μυκητιασικές λοιμώξεις (*Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*),
- Πνευμονία σε ανοσοκατασταλμένους: AIDS, μεταμόσχευση οργάνου (*Nocardia*, *Actino-*

myces, *Toxoplasma gondii*, Leishmania, Cryptococcus, *Pneumocystis jiroveci* -πρώην *carinii*-, *Mycoplasma pneumoniae*, Chlamydiae),

- Παρασιτικές λοιμώξεις (*Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*).

Ενίοτε σε επιλεγμένες βαριές κλινικές οντότητες, όπως σε επιπλεγμένη πνευμονία της κοινότητας (CAP), ιογενείς λοιμώξεις από αναπνευστικούς ιούς και ερπητοϊούς με σοβαρή κλινική προβολή, είναι δυνατό να γίνει λήψη BAL για καλλιέργεια ή εφαρμογή μοριακών τεχνικών.

Υλικό με προστατευμένη βρογχική βούρτσα

Τεχνική συλλογής

Η τεχνική εφαρμόζεται από το 1979 για την λήψη υλικού από ορατή ενδοβρογχική αλλοίωση ή μη ορατή (περιφερική αλλοίωση) με την εισαγωγή διπλού «τηλεσκοπικού» καθετήρα μέσω του βρογχοσκοπίου. Δια μέσου του εξωτερικού καθετήρα προωθείται και εισάγεται χωρίς να περάσει από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ο εσωτερικός καθετήρας που καταλήγει στη βούρτσα. Οι περιπτώσεις στις οποίες εφαρμόζεται η τεχνική της βούρτσας είναι κυρίως η βακτηριακή πνευμονία. Αν και μειονεκτεί σημαντικά σε ευαισθησία, είναι υψηλής ειδικότητας (95%).⁸

Το υλικό συλλέγεται αφού η βούρτσα πολυάριθμων τριχών εισέλθει εντός του αυλού του δικάναλου FFB (Εικόνα 1). Όταν η βούρτσα φθάσει σε ορατή ενδοβρογχική αλλοίωση, συλλέγονται εκκρίσεις από τον βρόγχο και στην συνέχεια ανασύρεται. Συνιστάται η βούρτσα να αφαιρείται μαζί με το ινοβρογχοσκόπιο, διότι έτσι λαμβάνονται περισσότερα κύτταρα και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε 1 ml φυσιολογικού ορού ή 1 ml ζωμού Brain Heart Infusion (ποσότητα συλλογής εκκρίσεων 0,001-0,01 ml). Η βούρτσα πρέπει να αναδεύεται καλά ώστε να αποκολληθεί όλο το υλικό που βρίσκεται επάνω της και στη συνέχεια αυτό προωθείται για περαιτέρω επεξεργασία και ποσοτική καλλιέργεια στο Κλινικό Εργαστήριο. Η τεχνική PSB ενδείκνυται ιδιαίτερα για κυτταροκαλλιέργειες ιών. Η χρήση της προστατευμένης βούρτσας για την συλλογή υλικού μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης από βακτήρια του ανώτερου αναπνευστικού και βελτιώνει την διαγνωστική ακρίβεια των βρογχοσκοπικών τεχνικών (Πίνακας 1).^{1,3,4,9}

Σε περιπτώσεις ασθενών με σοβαρή πνευμονία της κοινότητας η μέθοδος PSB φαίνεται



Εικόνα 1. Τρόπος λήψης υλικού με την τεχνική της προστατευμένης βρογχικής βούρτσας.

Πίνακας 1. Σύγκριση διαγνωστικών τεχνικών για λήψη δείγματος από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα για καλλιέργεια.^{4,8}

Μη βρογχοσκοπικές τεχνικές	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
Λήψη ενδοτραχειακών εκκρίσεων	38-100	14-100
Τυφλή δειγματοληψία (BBS)	74-97	74-100
Mini-BAL	63-100	66-96
Τυφλή δειγματοληψία με PSB (BPSB)	58-86	71-100
Βρογχοσκοπικές τεχνικές		
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)	42-93, 73*	45-100, 82*
Προστατευόμενη βρογχική βούρτσα (PSB)	33-100, 67*	50-100, 95*

*Διάμεση τιμή

ότι είναι εξαιρετικά ασφαλής και έχει υψηλή ειδικότητα. Συνιστάται να εφαρμόζεται όχι στην καθημερινή πράξη αλλά ως τρόπος επανεκτίμησης ασθενών με CAP που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία.¹

Η διαγνωστική ευαισθησία των βρογχοσκοπικών τεχνικών μπορεί να βελτιωθεί^{1,4}

- αναλόγως της αιτιολογίας της πιθανολογούμενης διάγνωσης,
- με την ορθή στόχευση της βρογχικής και πνευμονικής αλλοίωσης και
- με το συνδυασμό του πρωτοκόλλου της τεχνικής BAL με άλλες παρόμοιες.

Η ευαισθησία του BAL φαίνεται ότι υπερβαίνει εκείνη της προστατευμένης βούρτσας σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (50% έναντι 22%), ενώ ο συνδυασμός τους ανέρχεται περίπου σε 70%.^{1,4}

Σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεως πνευμόνων και καρδιάς ο ρόλος του BAL φαίνεται να υπερισχύει της τεχνικής PSB. Στους ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού, η ευκαιριακή πνευμονική λοίμωξη διαγιγνώσκεται με το BAL άνω του 90% με επικρατούντες αιτιολογικούς παράγοντες την *Pneumocystis jiroveci*, τα είδη *Candida*, τον CMV αλλά και κοινά παθογόνα βακτήρια.¹

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

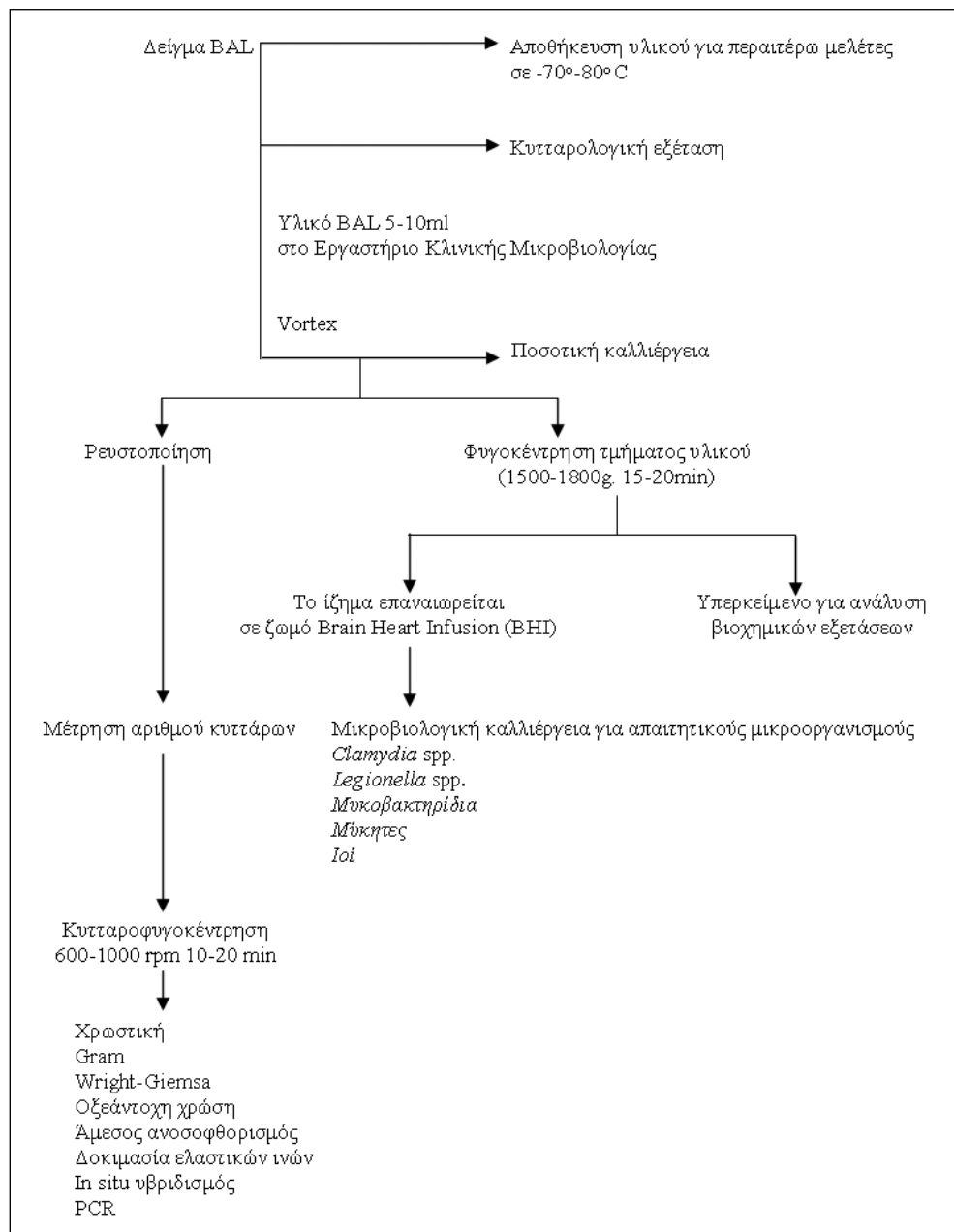
Μικροσκοπική εξέταση

Τα δείγματα μετά την ομογενοποίηση σε Vortex και την ποσοτική καλλιέργεια, εάν είναι βλενώδη υφίστανται επεξεργασία με ειδική ρευστοποιητική ουσία dithiothreitol (sputasol).

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων καθορίζεται με κυτταρομετρία ροής και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε κυτταροφυγόκεντρο (600-800 rpm για 20 min). Η κυτταροφυγόκεντρος βρίσκει ιδιαίτερα ευρεία εφαρμογή στην προετοιμασία ξηρών παρασκευασμάτων που περιέχουν κατά προσέγγιση 4×10^4 κύτταρα/ml. Ορισμένοι ερευνητές συνιστούν την διήθηση BAL διαμέσου αποστειρωμένης γάζας πριν την διαδικασία της φυγοκέντρησης, για την απομάκρυνση των βλεννωδών στοιχείων. Υπάρχει όμως κίνδυνος παγίδευσης μικροοργανισμών στην βλέννη.^{4,9}

Από το ίζημα ετοιμάζονται ξηρά παρασκευάσματα για χρώση Gram και άλλες ειδικές χρώσεις όπως Giemsa, οξεάντοχη χρώση Ziehl-Neelsen για την αναζήτηση μυκοβακτηριδίων, τροποποιημένη οξεάντοχη χρώση για την ανίχνευση *Nocardia*, ενώ για την αναζήτηση μυκήτων και *Pneumocystis* απαιτείται ποικιλία χρωστικών των κυτταρικών τοιχωμάτων (Gomori's methenamine silver, toluidine blue, calcofluor white). Σε δεύτερη φάση το δείγμα

φυγοκεντρείται σε 1500-1800 g για 15-20 min και το ίζημα χρησιμοποιείται για ειδικές μικροβιολογικές εξετάσεις, ενώ το υπερκείμενο φυλάσσεται για βιοχημικές αναλύσεις, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.^{4,8}



Εικόνα 2. Αλγόριθμος επεξεργασίας δείγματος βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL).⁴

Θετική χαρακτηρίζεται η Gram χρώση, όταν κατά τη μικροσκοπήση με μικρή μεγέθυνση (10×) ανευρίσκεται ένας μικροοργανισμός ανά οπτικό πεδίο. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ένα μέχρι δέκα βακτήρια στη Gram χρώση, αντιστοιχούν σε αριθμό μικροβιακού φορτίου $\geq 10^4$ cfu/ml στην καλλιέργεια του BAL.^{4,10}

Η Gram χρώση είναι απλή, φθηνή και γρήγορη μέθοδος αφού σε μία ώρα από την αποστολή του δείγματος δίνει πληροφορίες που βοηθούν στην επιλογή της σωστής εμπειρικής αντιμικροβιακής θεραπείας. Ο εργαστηριακός γιατρός αξιολογεί ημιποσοτικά την παρουσία λευκοκυττάρων, επιθηλίων και μικροοργανισμών (λίγα- αρκετά-πολλά) εκτιμώντας παράλληλα και την ποιότητα του δείγματος. Στη γραπτή απάντηση του Εργαστηρίου αναφέρεται: α) αποκλειστική παρουσία ενός μικροοργανισμού, β) επικράτηση ενός μικροοργανισμού επί παρουσίας μεικτού μικροβιακού πληθυσμού, γ) παρουσία μεικτού μικροβιακού πληθυσμού και δ) απουσία μικροοργανισμών.

Στα δείγματα BAL η αναλογία των κυττάρων φλεγμονής σε σχέση με τα πλακώδη και τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα είναι αρκετή για να δείξει το βαθμό επιμόλυνσης από το στοματοφάρυγγα.. Στο φυσιολογικό BAL υπερτερούν τα κυψελιδικά μακροφάγα (>90%), ενώ τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία υπάρχουν σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Τα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα πρέπει να είναι <1%, διαφορετικά η παρουσία τους δηλώνει επιμόλυνση με χλωρίδα του στοματοφάρυγγα.⁹

Με την Gram χρώση επιτυγχάνεται η καταγραφή της αναλογίας του αριθμού των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων, καθώς και η διάκριση των ειδικών μορφολογικών τύπων των βακτηρίων, ενδοκυτταρίων και εξωκυτταρίων, που συνδέονται με την λοίμωξη. Η απουσία ευρημάτων επί κλινικής υποψίας ενισχύει την πιθανότητα άτυπης πνευμονίας (*Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp, φυματίωση, παράσιτα).^{1,4,10}

Η άμεση μικροσκοπική εξέταση σε δείγματα PSB με χρώση Gram έχει χαμηλή ευαισθησία και η διαγνωστική της αξία αυξάνεται με τον εμπλουτισμό που επιτυγχάνεται με διαδοχικές προσθήκες σταγονιδίων του διαλύματος PSB.⁴

Η ποσοτική καταμέτρηση των κυττάρων, όπως εμφανίζεται σε παρασκευάσματα κεχωρημένα με χρώση May-Giemsa, βοηθάει στη διαφορική διάγνωση σημαντικών πνευμονικών παθήσεων (Πίνακας 2).¹¹ Σημαντικό ρόλο στην ορθή ανάλυση των αποτελεσμάτων κατέχει η ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια της λήψης του BAL.^{4,11}

Ιδιαίτερη διαγνωστική αξία εμφανίζει η παρουσία ενδοκυτταρίων μικροοργανισμών (2-25%) στα κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα στο BAL για την διάγνωση της VAP σε ασθενείς της ΜΕΘ. Η ευαισθησία αυτού του δείκτη κυμαίνεται από 73- 100% και η ειδικότητα είναι >90% για την διάγνωση της VAP. Βέβαια, όταν έχει προηγηθεί αντιμικροβιακή θεραπεία η ευαισθησία μειώνεται σημαντικά.¹²

Για την ανίχνευση ειδικών μικροοργανισμών όπως *Legionella* spp, Herpes simplex virus, CMV, αναπνευστικών ιών, *Pneumocystis jiroveci*, υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά συστήματα για την εφαρμογή τεχνικών ανοσοφθορισμού, ενώ για τους ιούς HSV και CMV υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής in situ υβριδισμός και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Εικόνα 2).^{4,9}

Ανίχνευση ελαστικών ινών

Άλλη σημαντική παράμετρος είναι η ανίχνευση ελαστικών ινών στα δείγματα βρογχοσκόπησης. Οι ελαστικές ίνες προέρχονται από καταστροφή του παρεγχύματος που συνδέεται με νεκρωτική πνευμονία από αερόβια Gram αρνητικά βακτήρια – Enterobacteriaceae (*Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp). Η μέθοδος είναι απλή και επιτυγχάνεται με την

Πίνακας 2. Αξιολόγηση των κυτταρικών ευρημάτων κατά τη μικροσκοπική εξέταση σε συσχέτιση με πνευμονικά νοσήματα.^{4,11}

	Κυψελιδικά μακροφάγα	Λεμφο- κύτταρα	Ουδετε- ρόφιλα	Ηωσινό- φιλα	Διαγνωστική ικανότητα
Φυσιολογικές τιμές	>90%	5-10%	1-5%	<1%	
Σαρκοείδωση		20-60%	Κ.Φ.	1-5%	>60%
Πνευμονίτιδα εξ υπέρ-ευαισθησίας	Αφρώδης εμφάνιση	>60%	1-10%	1-5%	>80%
Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση		5-20%	10-20%	1-10%	>60%
Ηωσινοφιλική πνευμονία		10-20%	1-5%	>20%	>95%
Νοσήματα συνδετικού ιστού		5-30%	1-20%	1-5%	>50%

χρήση διαλύματος ΚΟΗ. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η δοκιμασία βρίσκεται θετική στο 47% των ασθενών με VAP και σε μικρότερο ποσοστό στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων (ARDS) σε σχέση με τα υγιή άτομα (8%).^{3,4,11}

ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

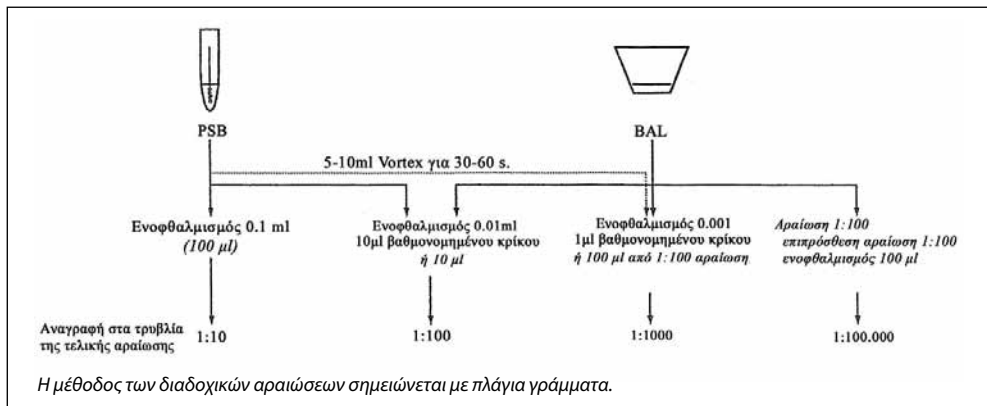
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

Η επεξεργασία του BAL ή PSB διενεργείται εντός του θαλάμου βιολογικής ασφάλειας και ο κλινικός μικροβιολόγος για όλους τους χειρισμούς πρέπει να τηρεί σχολαστικά όλες τις οδηγίες του πρωτοκόλλου επεξεργασίας του Εργαστηρίου. Η καλλιέργεια BAL θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς ιδιαίτερα για τη VAP και την πνευμονία από εισρόφηση. Δείγματα 5-10 ml χρησιμοποιούνται αυτούσια χωρίς φυγοκέντρηση, αφού προηγηθεί ομογενοποίηση σε Vortex για 30-60 sec. Η ποσότητα 10 ml μέχρι 100 ml δείγματος BAL θεωρείται ότι περιέχει 1 ml βρογχοπνευμονικών εκκρίσεων.^{1,3,4,10}

Στην καλλιέργεια BAL γίνεται ποσοτική καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών που αναπτύσσονται και διενεργείται με δύο τρόπους, με βαθμονομημένο μικροβιολογικό κρίκο, και εκατονταπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις.^{4,13}

Με μικροβιολογικό κρίκο ορισμένης διαμέτρου 0,01 ml και 0,001 ml λαμβάνεται ποσότητα 10 μl και 1 μl του υλικού BAL αντίστοιχα και ενοφθαλμίζονται στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά: αιματούχο άγαρ, Mac Conkey άγαρ, σοκολατόχρωμο άγαρ, Sabouraud άγαρ και θειογλυκολικό ζωμό, ενώ σημειώνεται στα τρυβλία η αντίστοιχη αραιώση 1:100 και 1:1000. Τα τρυβλία επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες στους 35 °C για 4-7 ημέρες.

Ανάπτυξη μικροβίων στην καλλιέργεια BAL σε αριθμό $\geq 10^4$ cfu/ml είναι ενδεικτική λοίμωξης. Το συγκεκριμένο διαγνωστικό όριο του αριθμού των αποικιών $\geq 10^4$ cfu/ml αντιπροσωπεύει μικροβιακό φορτίο 10^5 cfu/ml μέχρι 10^6 cfu/ml στην εξεταζόμενη πνευμονική περιοχή.⁴ Η παρουσία ενδοκυτταρίων βακτηρίων σε ποσοστό >7% του συνολικού αριθμού των κυττάρων συσχετίζεται με πνευμονία VAP. Μία αποικία από κάθε τρυβλίο αντιστοιχεί σε 100 cfu/ml και 1000 cfu/ml του αρχικού δείγματος BAL, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3. Αλγόριθμος ποσοτικής καλλιέργειας δείγματος βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) και προστατευόμενης βρογχικής βούρτσας (PSB).⁴

Μετά την φυγοκέντρηση το ίζημα χρησιμοποιείται για ειδικές χρώσεις, ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι να τελειώσει η καλλιέργεια.

Επί απουσίας ανάπτυξης βακτηρίων, όταν στην Giemsa υπάρχουν πολλά πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μορφότυποι βακτηρίων, εφαρμόζεται άμεσος ανοσοφθορισμός (DFA) για *Legionella*, ενώ αναζητούνται ιοί, μύκητες και *Pneumocystis*. Σε ανοσοκατασταλμένους κυρίως ασθενείς πρέπει να γίνεται αναζήτηση αντιγόνου του μύκητα για *Histoplasma* και *Aspergillus* spp. επειδή οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν αναπτύσσονται στα συνήθη θρεπτικά υλικά.^{4,9}

Υλικό με προστατευμένη βρογχική βούρτσα

Η ποσοτική καλλιέργεια PSB γίνεται όπως και το BAL με μικροβιολογικό κρίκο ορισμένης διαμέτρου ή διαδοχικές αραιώσεις.

Το υλικό PSB (1 ml NaCl ή 1 ml ζωμού BHI) ομογενοποιείται σε Vortex για 30 sec. Ποσότητα 100 μ l και 10 μ l καλλιεργείται στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (αιματούχο άγαρ με βιταμίνη K και αιμίνη, αιμολυμένο αιματούχο άγαρ με kanamycin και vancomycin, bacteroides bile esculin άγαρ και phenylethyl alcohol άγαρ), δεδομένου ότι η τεχνική PSB ενδείκνυται ιδιαίτερα στην διάγνωση αναεροβίων πνευμονικών λοιμώξεων. Μία αποικία από το τρυβλίο αντιστοιχεί σε 10 cfu/ml αρχικού δείγματος. Εάν χρησιμοποιήσουμε τον βαθμονομημένο κρίκο 0,01 ml (αραίωση 1:100) καλλιεργούνται 10 μ l στα τρυβλία, οπότε μία αποικία αντιστοιχεί σε 100 cfu/ml του αρχικού δείγματος.

Ανάπτυξη στην καλλιέργεια PSB $\geq 10^3$ cfu/ml είναι ενδεικτική ενεργού λοίμωξης.^{3,4,10}

Σε ασθενείς με σοβαρή εικόνα CAP που δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία η μέθοδος PSB είναι εξαιρετικά ασφαλής και με υψηλή ειδικότητα. Από μελέτες έχει τεκμηριωθεί ότι εάν το υλικό PSB έχει επιμολυνθεί από χλωρίδα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος οι αποικίες του υπεύθυνου μικροοργανισμού δεν ξεπερνούν τις 10^3 cfu/ml.^{1,3}

Σε όλες τις περιπτώσεις πνευμονίας επιβάλλεται η παράλληλη λήψη αιμοκαλλιιεργειών από τους ασθενείς.⁴

Πίνακας 3. Θρεπτικά υλικά για αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια.

Αερόβια Καλλιέργεια	Αναερόβια Καλλιέργεια
Αιματούχο άγαρ	Αιματούχο άγαρ* με βιταμίνη Κ (1μg/ml) & αιμίνη (5μg/ml)
MacConkey άγαρ	Bacteroides Bile Esculin (BBE) άγαρ*
Σοκολατόχρωμο άγαρ	Kanamycin**-vancomycin(KVA) αιμολυμένο αιματούχο άγαρ *για χρωματισμένες αποικίες <i>Prevotella</i> και <i>Bacteroides</i> sp.
Sabouraud άγαρ	Phenylethyl alcohol (PEA) αιματούχο άγαρ *προβάτου
	Θειογλυκολικός ζωμός ή Cooked meat ζωμός για α/α

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Οι βρογχοσκοπικές τεχνικές (BAL, PSB) υπερέχουν σε σχέση με τις άλλες μη βρογχοσκοπικές τεχνικές (κυρίως με την καλλιέργεια πτυέλων) ως προς την ευαισθησία (73%, 67% αντίστοιχα) και την ειδικότητα (82%, 95%), στην αιτιολογική διερεύνηση τόσο της ενδονοσοκομειακής όσο και της πνευμονίας της κοινότητας. Η ποσοτική καλλιέργεια θεωρείται απαραίτητη για την διάγνωση της πνευμονίας του αναπνευστήρα, πνευμονίας από εισρόφηση, πνευμονίας ανοσοκατασταλμένων ατόμων (AIDS, μεταμοσχευθέντες), ασθενών με κυστική ίνωση και φυματίωση. Η διενέργεια του BAL φαίνεται ιδιαιτέρως υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας στην διάγνωση της πνευμονίας από *Pneumocystis*, σε περιπτώσεις πνευμονίας σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, ενώ υπάρχει διχογνωμία για την συμβολή της στην αντιμετώπιση της CAP.^{7,14}

Τα συχνότερα μικροβιακά αίτια της πνευμονίας σε ασθενείς της ΜΕΘ είναι: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. και πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter baumannii*. Η VAP είναι πολυμικροβιακή σε 20-40% των περιπτώσεων, ενώ ο ρόλος των αναερόβιων δεν έχει σαφώς καθορισθεί.⁵

Στην πνευμονία από εισρόφηση που είναι συνήθως πολυμικροβιακή, τα ανερόβια της χλωρίδας του στόματος όπως *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* και αναερόβιοι κόκκοι είναι υπεύθυνα σε μεγάλο ποσοστό, είτε μόνα τους, είτε μαζί με αερόβια βακτήρια.

Στο σύνδρομο του μέσου λοβού απομονώνονται συχνότερα στελέχη *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* και στελέχη *Staphylococcus aureus* τα οποία συνήθως επικρατούν. Ερευνητές υποστηρίζουν ότι η μικροβιακή λοίμωξη παίζει σημαντικό ρόλο στην επιμονή της ατελεκτασίας σε αυτό το σύνδρομο.¹⁵

ΓΡΑΠΤΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Ο γιατρός που λαμβάνει τη γραπτή απάντηση των αποτελεσμάτων καλλιέργειών δειγμάτων που λαμβάνονται με επεμβατικές τεχνικές (BAL, PSB), θα πρέπει να έχει από πριν συγκεκριμένες πληροφορίες που θα τον διευκολύνουν να κατανοήσει τα γραφόμενα.^{4,9}

1) Τα βακτήρια που έχουν πάντοτε διαγνωστική αξία, ανεξάρτητα του καθορισμένου δια-

γνωστικού ορίου αριθμού ανάπτυξης αποικιών (διαγνωστικό όριο BAL $\geq 10^4$ cfu/ml, PSB $\geq 10^3$ cfu/ml) είναι τα εξής: *Streptococcus pyogenes*, Group B *Streptococci* (παιδιατρικός πληθυσμός), *Francisella tularensis*, *Bordetella* spp(κυρίως *B. bronchiseptica*), *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Nocardia*, *Bacillus anthracis*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydiae pneumoniae*, *Pneumocystis jiroveci*, *Toxoplasma gondii*, Υφομύκητες (όταν δεν θεωρούνται σαπρόφυτα του περιβάλλοντος π.χ. *Penicillium* spp).

- 2) Τα βακτήρια που αναφέρονται όταν ο αριθμός αποικιών είναι BAL $\geq 10^4$ cfu/ml και PSB $\geq 10^3$ cfu/ml χωρίς να επικρατούν του μικροβιακού πληθυσμού είναι τα εξής: *Streptococcus pneumoniae* (καταγραφή αντιμικροβιακής ευαισθησίας-AST), *Haemophilus influenzae* (καταγραφή παραγωγής β-λακταμάσης), *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* (αξιολόγηση μόνο σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* (AST), *Burkholderia* (AST).
- 3) Τα βακτήρια που αξιολογούνται όταν ο αριθμός αποικιών είναι BAL $\geq 10^4$ cfu/ml και PSB $\geq 10^3$ cfu/ml και επικρατούν του μικροβιακού πληθυσμού είναι τα εξής: *Staphylococcus aureus* (MRSA), αερόβια Gram αρνητικά βακτήρια (ειδικά η *Klebsiella pneumoniae*), *Corynebacterium* (σε δείγματα ασθενών ΜΕΘ), *Rhodococcus equi* (σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα), *Streptococci* group B (ενήλικοι), C και G.

Από τους βλαστομύκητες, τα είδη *Candida* spp. δεν θεωρούνται αίτιο πνευμονίας αλλά αποικιστές του στοματοφάρυγγα. Ακόμα και σε ανοσοκατασταλμένα άτομα σπάνια ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη πνευμονίας και έτσι δεν θεωρείται απαραίτητη η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους.

Τα διάφορα είδη βακτηρίων, όπως πρασινίζοντες, στρεπτόκοκκοι, *Neisseria* spp. *Haemophilus* spp, *Rothia*, *Eikenella*, διφθεροειδή, καταγράφονται ως μόνιμοι αποικιστές του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Μικροοργανισμοί όπως *Enterococci* και *Staphylococci* coagulase negative όταν βρίσκονται σε αποκλειστική ανάπτυξη, αναφέρονται ως μεικτή παρουσία Gram θετικών κόκκων.

Αρνητική χαρακτηρίζεται η καλλιέργεια όταν δεν απομονώνεται λοιμογόνος παράγοντας και όταν το διαγνωστικό όριο του αριθμού ανάπτυξης αποικιών είναι BAL $< 10^4$ cfu/ml και PSB $< 10^3$ cfu/ml.

Ως **ψευδώς αρνητική** μπορεί να χαρακτηριστεί η καλλιέργεια όταν συνυπάρχει επιμόλυνση με χλωρίδα του στοματοφάρυγγα (BAL $< 10^4$ cfu/ml και PSB $< 10^3$ cfu/ml) ή έχει προηγηθεί αντιμικροβιακή αγωγή.

Μία **θετική** καλλιέργεια με *Streptococcus pneumoniae* είναι πάντοτε ενδεικτική ενεργού λοίμωξης, αν και η ύπαρξη φορείας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Θετική καλλιέργεια όπου Gram αρνητικό βακτήριο (*Enterobacteriaceae*) ή *Staphylococcus aureus* επικρατεί μεταξύ του υπόλοιπου μικροβιακού πληθυσμού, είναι ενδεικτική λοίμωξης όταν συμφωνούν και τα αποτελέσματα της Gram χρώσης με την μορφολογία αυτών των μικροοργανισμών.

Ως **ψευδώς θετική** χαρακτηρίζεται μία καλλιέργεια όταν γίνεται υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων. Όταν ο αριθμός των αποικιών των βακτηρίων είναι οριακός για τη διάγνωση πνευμονίας, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με βάση τις κλινικές πληροφορίες, την χορήγηση αντιβιοτικών πριν την επεμβατική τεχνική και τα φλεγμονώδη κυτταρικά στοιχεία του BAL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Πολυζωγόπουλος Δ, Πολυχρονόπουλος ΒΛ. Κλινική Πνευμονολογία, Τόμος Α, Β΄ Έκδοση. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης; 2005. p. 805-849.
2. Μαλάμου-Λαδά Ε. Εργαστηριακή διερεύνηση πνευμονίας. Καλλιεργητικές μέθοδοι και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Εφαρμ Κλιν Μικρ 2002; 7: 165-173.
3. Investigation of bronchoalveolar lavage, sputum and associated specimens. Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Centre for Infections. London: 2007. p. 1-27.
4. Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 533-558.
5. Chastre J, Facon JY, Bornet-Lesco M, Calvat S, Dombert MC, Khani AR, et al. Evaluation of Bronchoscopic Techniques for the diagnosis of Nosocomial Pneumonia. Am J Respir Cit Care Med 1995; 152: 2331-2240.
6. de Blic D, Midulla F, Barbato A, Clement A, Dab I, Eber E, et al. Bronchoalveolar lavage in children. Eur Respir 2000; 15: 217-231.
7. Goldstein RA, Rohatgi PK, Bergofsky EH, Black ER. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. American Thoracic Society. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 481-486.
8. Πλατσούκα Ε. Λοιμώξεις στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας. Κλινικό Φροντιστήριο, Ημέρες Κλινικής Μικροβιολογίας. Αθήνα: 2007. p. 20-31.
9. York MK, Gilligan P. Lower Respiratory Tract cultures. In: H.D. Isenberg (Editor-in-Chief), Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2004. p. 3.11.2.1-3.11.2.15.
10. Thorpe JE, Banghman RP, Frame PT, Wesseler TA, Staneck LJ. Bronchoalveolar lavage for diagnosing acute bacterial pneumonia. J Infect Dis 1987; 155: 855-861.
11. Robinson-Smith TM, Saad A, Baughman PR. Interpretation of the Wright-Giemsa stained bronchoalveolar lavage specimen. Laboratory Medicine 2004; 35: 553-557.
12. Wahl WL, Franklin GA, Brandt M, Sturm L, Ahrns KS, Hemmila MR, et al. Does bronchoalveolar lavage enhance our ability to treat ventilator-associated pneumonia in a trauma – burn intensive care unit. J Trauma 2003; 54: 633-639.
13. Jacobs JA, Brauwer GB, Cornelissen EJ, Drent M. Accuracy and Precision of Quantitative Calibrated Loops in transfer of bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol 2000; 38: 2117-2121.
14. Dalhoff K, Braun J, Hollandt H, Lipp R, Wiebmann KJ, Marre R. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in patients with opportunistic and non opportunistic bacterial pneumonia. Infection 1993; 21: 291-296.
15. Priftis KN, Mermiri D, Papadopoulou A, Anthracopoulos MB, Vaos G, Nicolaidou P. The role of timely intervention in middle lobe syndrome in children. Chest 2005; 128: 2504-2510.

Κυτταρολογική ανάλυση βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος στα παιδιά

Μ. Παπαδόπουλος, Κ. Τσακανίκα, Κ. Πρίφτης

Η λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (bronchoalveolar lavage, BAL) αποτελεί τεχνική συλλογής του υγρού που επαλείφει το αναπνευστικό επιθήλιο (epithelial lining fluid, ELF) των τελικών βρογχολίων και των κυψελίδων. Η τεχνολογική πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια και η εμπειρία που έχει αθροισθεί επέτρεψαν την ευρεία εφαρμογή του, όχι μόνο στους ενηλίκους, αλλά και στους παιδιατρικούς ασθενείς, για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς.¹⁻⁵

Η κυτταρολογική εξέταση του BAL στα παιδιά αφορά στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών όπως και στους ενηλίκους. Τα αποτελέσματα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο λήψης, συντήρησης και προετοιμασίας του αναρροφηθέντος υγρού. Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται πρώτα η διαδικασία λήψης και μεταφοράς του BAL στο κυτταρολογικό εργαστήριο και στη συνέχεια συζητείται η κλινική αξία των πληροφοριών που μας παρέχει.^{1,3}

Η ΤΕΧΝΙΚΗ

Η λήψη του BAL στα παιδιά μετά την νεογνική ηλικία γίνεται κατά την διάρκεια της ινοβρογχοσκόπησης. Σε παιδιά κάτω των 8-9 ετών χρησιμοποιείται συνήθως ινοβρογχοσκόπιο με εξωτερική διάμετρο 3,5-3,7 mm, ενώ στα μεγαλύτερα, εκείνο με 4,6-4,9 mm.^{2,5} Εναλλακτική λύση σε επιλεγμένες περιπτώσεις διασωληνωμένων ασθενών αποτελεί η χρήση σωλήνα σίτισης.⁶

Η διαδικασία λήψης γίνεται σε βαθιά καταστολή ή γενική αναισθησία με αυτόματη αναπνοή. Τα φάρμακα που χορηγούνται είναι το σεβοφλουράνιο ή αλοθάνιο σε συνδυασμό με προποφόλη κάτω από την συνεχή επίβλεψη αναισθησιολόγου και με στενή καρδιοαναπνευστική παρακολούθηση. Επιπρόσθετα χορηγείται ατροπίνη ενδοφλεβίως για την αποφυγή βραδυκαρδίας μετά από διέγερση του παρασυμπαθητικού και λιδοκαΐνη τοπικά για την πρόληψη λαρυγγόσπασμου.^{1,2}

Η επιλογή της θέσης λήψης του BAL εξαρτάται από την ανατομική εντόπιση της βλάβης σύμφωνα με τα ακτινολογικά ή ενδοσκοπικά ευρήματα. Σε περιπτώσεις όπου οι αλλοιώσεις είναι διάχυτες προτιμάται η λήψη από το μέσο λοβό λόγω καλύτερης επαναφοράς του υγρού. Στα βρέφη είναι συνήθως ευκολότερη η λήψη του BAL από τον δεξιό κάτω λοβό.^{2,5}

Η διαδικασία έκπλυσης περιλαμβάνει την έγχυση, μέσω του ενσφηνωμένου ινοβρογχοσκοπίου στον τμηματικό βρόγχο, φυσιολογικού ορού προθερμασμένου στους 37 °C.

Ο όγκος του εγχυόμενου φυσιολογικού ορού και ο αριθμός των δειγμάτων που επαναροφώνται εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο. Κοινό ζητούμενο είναι η λήψη εκπλύματος αντιπροσωπευτικού του κυψελιδικού διαμερίσματος ανεξαρτήτως ηλικίας και σωματομετρικών χαρακτηριστικών. Στα παιδιά με σωματικό βάρος <20 kg χρησιμοποιούνται 3 ml/kg φυσιολογικού ορού διαιρεμένου σε τρία ίσα κλάσματα. Στα μεγαλύτερα παιδιά ο υπολογισμός γίνεται με τον ίδιο τύπο και ο ορός χορηγείται σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις των 20 ml. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται σταθερά κλάσματα των 10-20 ml ανεξάρτητα από το βάρος και την ηλικία του παιδιού.

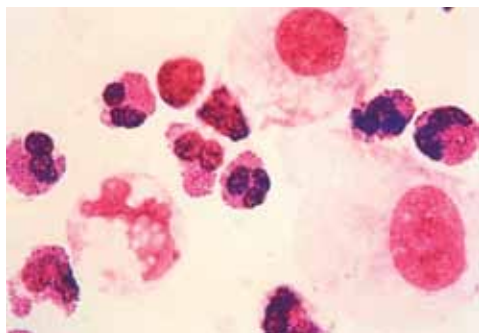
Η έγχυση γίνεται με σύριγγα μέσω του καναλιού εργασίας και ακολουθεί η χορήγηση ικανής ποσότητας αέρα ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν παραμένει ορός στο νεκρό χώρο του καναλιού.¹⁻³ Η επιστροφή γίνεται είτε με την χρήση συσκευής αναρρόφησης και κατάλληλης παγίδας είτε με την βοήθεια σύριγγας. Το πρώτο δείγμα εκπλύματος που συλλέγεται θεωρείται περισσότερο βρογχικής προέλευσης και χρησιμοποιείται ολόκληρο ή μέρος του για μικροβιολογικές εξετάσεις (καλλιέργεια). Τα επόμενα δύο δείγματα προορίζονται για κυτταρολογική εξέταση και προσδιορισμό μη κυτταρικών διαλυμένων ουσιών. Θεωρείται δεδομένο ότι όσο προχωρά η διαδικασία λήψης εκπλύματος η προέλευσή του είναι από περιφερικότερα τμήματα. Το BAL θεωρείται αποδεκτό εφόσον έχουμε επιστροφή >40% της συνολικής ποσότητας φυσιολογικού ορού που εγχύθηκε και με εξαίρεση το πρώτο δείγμα τα επόμενα θα πρέπει να περιέχουν λίγα επιθηλιακά κύτταρα.¹⁻³

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ

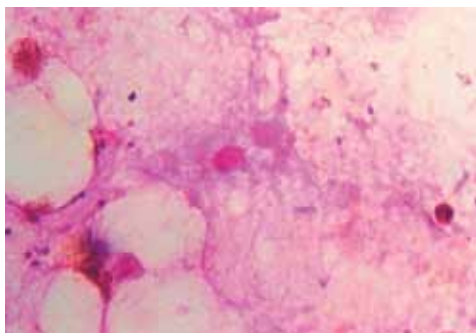
Το έκπλυμα διατηρείται μετά τη συλλογή του και προ της επεξεργασίας στους 4 °C για την μέγιστη δυνατή επιβίωση των κυτταρικών στοιχείων. Στη συνέχεια διηθείται μέσω αποστειρωμένης γάζας για την απομάκρυνση της βλέννης. Το πρώτο δείγμα εξαιρείται από την διαδικασία φιλτραρίσματος γιατί συχνά μαζί με την βλέννη, απομακρύνονται και μικροοργανισμοί.

Το πρώτο δείγμα έχει μικρότερο όγκο, περιέχει μικρότερο ποσοστό κυτταρικών στοιχείων, λιγότερα λεμφοκύτταρα και περισσότερα πολυμορφοπύρρηνα συγκριτικά με τα επόμενα. Χρησιμοποιείται για καλλιέργεια και λοιπές μικροβιολογικές εξετάσεις. Ενίοτε αξιοποιείται και για άλλες πληροφορίες εξαιτίας της βρογχικής του προέλευσης για παθήσεις των αεραγωγών όπως το άσθμα.^{1,3}

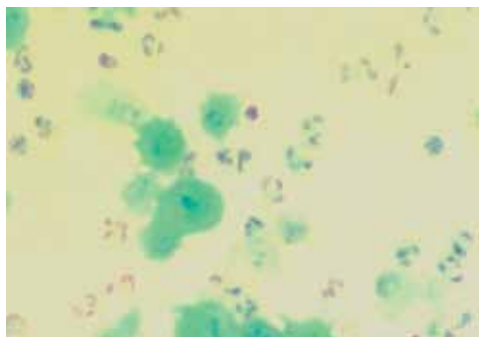
Η αρχική επεξεργασία για τη συλλογή πληροφοριών για τα κυτταρικά στοιχεία του υγρού περιλαμβάνει την αναφορά του όγκου του φυσιολογικού ορού που εγχύθηκε, τον υπολογισμό του συνολικού όγκου του ληφθέντος εκπλύματος και του ολικού αριθμού κυττάρων σε αυτό. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του δείγματος και η επεξεργασία του ιζήματος για την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του κυτταρικού τύπου. Οι χρώσεις που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών στα επιχρίσματα είναι η May-Grönwald-Giemsa και η Diff-Quik. Ωστόσο, αποτελεί πρακτική ρουτίνα στα περισσότερα κέντρα η χρήση περισσότερων χρώσεων, όπως η Παπανικολάου, η oil-red-O, η Pearls και η blue toluidine. (Εικόνες 1-6). Απαιτείται μέτρηση τουλάχιστον 500 κυττάρων για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων. Οι συνθήκες φυγοκέντρησης αφορούν ταχύτητες 250-500 ×g για 5-10 min και η τροποποίηση τους ενδέχεται να δώσει διαφορετικές τιμές. Αντίθετα, η χρήση κυτταρομετρίας ροής αντί της φυγοκέντρησης και της μέτρησης των κυττάρων σε επιχρίσματα αποτελεί επιλογή που δεν διαφοροποιεί σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα υπολογίζονται αλλά δεν προσμε-



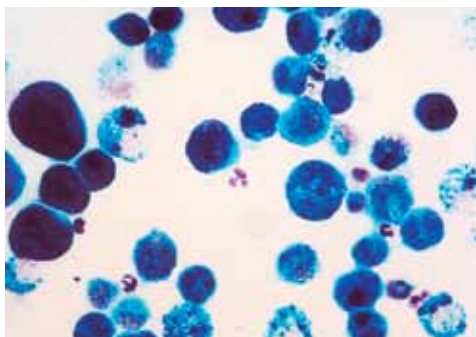
Εικόνα 1. Ασθενής με άσθμα και παρουσία αυξημένων ηωσινόφιλων στο BAL (χρώση Giemsa).



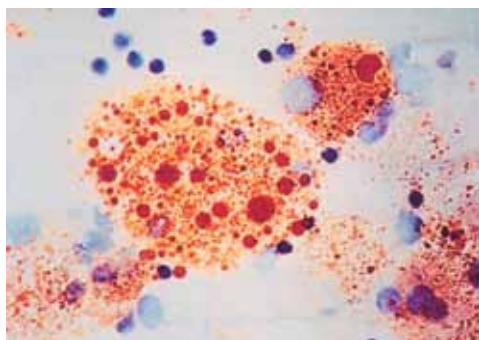
Εικόνα 4. Κυψελιδική πρωτεϊνωση. Παρατηρείται η χαρακτηριστική εικόνα με την άφθονη εξωκυτάρια ουσία (χρώση PAS).



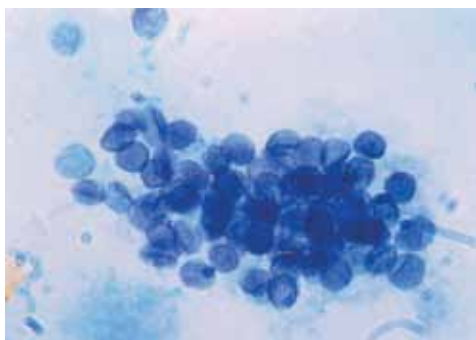
Εικόνα 2. BAL από ασθενή με λοίμωξη και αυξημένη παρουσία ουδετεροφίλων (χρώση PAP).



Εικόνα 5. BAL ασθενούς με κυψελιδική αιμορραγία. Χαρακτηριστική απεικόνιση των μακροφάγων που είναι πλήρη αιμοσιδηρίνης (χρώση Pearls).



Εικόνα 3. BAL από ασθενή με λιποειδική πνευμονία (χρώση oil-red-O).



Εικόνα 6. Ασθενής με HIV και λοίμωξη από πνευμονοκύστη (χρώση τροποποιημένη blue toluidine).

τρώνται στους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς. Οι μετρήσεις για τη συγκέντρωση των μη κυτταρικών συστατικών στο BAL (ανά ml BAL) γίνεται στο υπερκείμενο που προκύπτει μετά την φυγοκέντρωση και τον διαχωρισμό των κυττάρων.^{1,3,5}

Οι προσπάθειες υπολογισμού του ELF και το ποσοστό που αντιπροσωπεύει στο συνολικό όγκο του εκπλύματος που επιστρέφει δεν έχουν δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα. Η χρησιμοποίηση της ουρίας και της αλβουμίνης για τον έμμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης διαφόρων διαλυτών ουσιών στο ELF (σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στον ορό) είναι προβληματική λόγω αυξημένης κυψελίδο-τριχοειδικής διαπερατότητας στα παιδιά και δη σε εκείνα με αναπνευστική παθολογία. Στα πλαίσια των συγκεκριμένων δυσκολιών οι απόλυτοι αριθμοί, τα ποσοστά των κυτταρικών πληθυσμών και η υπολογιζόμενη μάζα των μη κυτταρικών συστατικών αναφέρονται σε ml BAL.¹

ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Η ανάγκη χορήγησης αναισθησίας και ο επεμβατικός χαρακτήρας της ινοβρογχοσκόπησης καθιστούν ηθικά και δεοντολογικά δύσκολη την διενέργεια μελετών με υγιή παιδιά για υιοθέτηση τιμών αναφοράς.^{1,2} Το υλικό που βασίστηκαν οι υπάρχουσες τιμές αναφοράς προέρχεται από μικρές σειρές παιδιών στα οποία η λήψη BAL έγινε με την ευκαιρία χειρουργικής επέμβασης ή ινοβρογχοσκόπησης για θορυβώδη αναπνοή από το ανώτερο αναπνευστικό χωρίς άλλη αναπνευστική παθολογία.¹ Επιπλέον, παρά τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν για την διόρθωση του ποσού του φυσιολογικού ορού που εγχέεται ανάλογα με το μέγεθος του παιδιού και την ηλικία του, εξακολουθεί να παραμένει η δυσκολία προτυποποίησης του ποσοστού επαναφοράς του εκπλύματος.^{1,7}

Η κυτταρική ανάλυση φαίνεται ότι δεν ακολουθεί κανονική κατανομή. Παρατηρείται σημαντική απόκλιση στις τιμές που αφορούν στο συνολικό αριθμό κυττάρων και στα επιμέρους ποσοστά λεμφοκυττάρων και ουδετερόφιλων. Όπως και στους ενήλικους, ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός είναι τα κυψελιδικά μακροφάγα (84-92%), ακολουθούν τα λεμφοκύτταρα (7-12%) και τα ουδετερόφιλα (0,9-3,2 %). Τέλος, τα ηωσινόφιλα ανευρίσκονται σε χαμηλό ποσοστό που φτάνει έως το 0,2% ενώ δεν υπάρχουν μαστοκύτταρα.^{1,8-13}

Ο συνολικός αριθμός κυττάρων στο BAL όπως και ο αριθμός επιθηλιακών κυττάρων μειώνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Τα βρέφη έχουν αυξημένο αριθμό πολυμορφοπύρηνων συγκριτικά με τα νήπια 13-36 μηνών. Η κύρια διαφορά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων είναι ο λόγος CD4+/CD8+ λεμφοκυττάρων που είναι μικρότερος στα παιδιά.^{1,10-13}

Δυσκολίες συναντά και η υιοθέτηση τιμών αναφοράς για τα μη κυτταρικά συστατικά στο BAL. Φαίνεται ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που προέρχονται από τον ορό είναι υψηλότερη στα παιδιά από τους ενήλικους, ενώ η διαφορά αυτή δεν αφορά στους τοπικά παραγόμενους μεσολαβητές, τη φιμπρονεκτίνη και το υαλουρονικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα (ΕΔΠ) είναι υψηλότερες στα μικρότερα παιδιά ενώ η συγκέντρωση των πεπτιδίων δεν επηρεάζεται από την ηλικία. Θέμα προς διευκρίνηση αποτελεί η επίδραση της αρνητικής πίεσης κατά την αναρρόφηση στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που προέρχονται από τον ορό.^{1,14-16}

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΕ ΑΝΟΣΟΪΚΑΝΑ ΠΑΙΔΙΑ

Η ινοβρογχοσκόπηση και ειδικότερα το BAL έχουν συγκεκριμένες ενδείξεις στον παιδιατρικό πληθυσμό που αφορούν στη διαγνωστική και θεραπευτική διαδικασία πνευμονικών

και συστηματικών νοσημάτων.^{1,2,5}

Αναλυτικότερα το BAL αποτελεί πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο σε:

- 1) Λοίμωξη αναπνευστικού^{1,17}
- 2) Μη λοιμώδεις αναπνευστικές παθήσεις¹
κυψελιδική πρωτεΐνωση
κυψελιδική αιμορραγία
ιστιοκυττάρωση πνεύμονα
- 3) Συστηματικά νοσήματα

Θεραπευτική ένδειξη έχει σε περιπτώσεις απόφραξης βρόγχων από εκκρίματα και στις περιπτώσεις λιποειδούς πνευμονίας από εξωγενές (εισρόφηση) ή ενδογενές αίτιο (κυψελιδική πρωτεΐνωση), με την απομάκρυνση του υλικού από τους πνεύμονες.^{1,5,17}

ΤΟ BAL ΣΤΗ ΛΟΙΜΩΞΗ

Βασική ένδειξη της ινοβρογχοσκόπησης στα παιδιά αποτελεί η επιβεβαίωση λοίμωξης μέσω της κυτταρολογικής εξέτασης και των καλλιιεργειών του BAL.

Διαπιστώνεται αύξηση του ολικού αριθμού και των πολυμορφοπύρηνων (ποσοστό και απόλυτος αριθμός) και σε συνδυασμό με την θετική καλλιέργεια ($>10^5$ cfu/ml BAL) και την αντίστοιχη κλινική εικόνα επιβεβαιώνεται η λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού. Η ανεύρεση πολυμορφοπύρηνων συνδυάζεται ενίοτε με την παρουσία μακροφάγων με έγκλειστα λίπους (λιποκύτταρα, lipid laden macrophages) στο BAL (Εικόνα 3). Το εύρημα είναι χαρακτηριστικό αλλά όχι αποκλειστικό των υποτροπιάζουσων εισροφίσεων. Τα πολυμορφοπύρηνα παρά την στενή συσχέτιση τους με την ύπαρξη υποκείμενης λοίμωξης ανευρίσκονται στο BAL παιδιών με άλλα φλεγμονώδη νοσήματα των αεραγωγών όπως είναι το άσθμα.^{1,3,5,17}

Η κυτταρολογική εξέταση ως εργαλείο στη διάγνωση της λοίμωξης συμπληρώνει τα αποτελέσματα των ποσοτικών καλλιιεργειών και των μοριακών τεχνικών (PCR) που συχνά αδυνατούν να δώσουν σαφείς πληροφορίες εξ αιτίας του κινδύνου επιμόλυνσης από το ανώτερο αναπνευστικό και της χαμηλής ειδικότητας αντίστοιχα.^{1,17}

ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΤΟ BAL ΘΕΤΕΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η μακροσκοπική εικόνα του BAL και τα αποτελέσματα της κυτταρολογικής εξέτασης είναι διαγνωστικά σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις.

Στην *κυψελιδική πρωτεΐνωση* το υγρό έχει γαλακτώδη εμφάνιση. Στα παρασκευάσματα που μονιμοποιούνται με τη χρώση May-Grönwald-Giemsa μετά την κυτταροφυγοκέντρηση παρατηρείται εξωκυττάριο βασεόφιλο υλικό, υλικό εντός των μακροφάγων που δίνει θετική την χρώση PAS, και μεγάλου μεγέθους αφρώδη κυψελιδικά μακροφάγα (Εικόνα 4). Για την διάγνωση της κυψελιδικής πρωτεΐνωσης αξιολογείται η συσσώρευση των συστατικών του ΕΔΠ στο BAL. Απαιτείται διαφοροδιάγνωση της ιδιοπαθούς από την δευτεροπαθή μορφή, που παρουσιάζεται σε ασθενείς με κακοήγη νοσήματα του αιμοποιητικού, μετά από εισπνοή χημικών και μετάλλων και σε λιποειδική πνευμονία από εισρόφηση.^{1,3,5,18}

Το BAL είναι επίσης διαγνωστικό στην *κυψελιδική αιμορραγία*. Μακροσκοπικά έχει αιμορραγική εμφάνιση ή είναι ροζ-πορτοκαλί απόχρωσης. Στη μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων ανευρίσκονται ελεύθερα ερυθρά αιμοσφαίρια, φαγοκυτταρομένα ερυθρά από τα μακροφάγα ή κυψελιδικά μακροφάγα με αιμοσιδηρίνη (σιδηροφάγα, hemosiderin laden

macrophages) (Εικόνα 5).^{1,3,5,19}

Η κυψελιδική αιμορραγία είναι ιδιοπαθής ή εμφανίζεται στα πλαίσια των ακόλουθων νοσολογικών καταστάσεων:¹

- αγγειίτιδες και νοσήματα του συνδετικού ιστού
- σπειραματονεφρίτιδα (σύνδρομο Goodpasture)
- λήψη φαρμάκων
- καρδιακές παθήσεις, αγγειακές δυσπλασίες πνευμόνων
- κακοήγη νοσήματα αιμοποιητικού και διαταραχές πήξης
- αλλεργία στο γάλα αγελάδας (σύνδρομο Heiner).

Σιδηροφάγα βρίσκονται στο έκπλυμα ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθειες ή άλλα αιμολυτικά σύνδρομα. Το ποσοστό των σιδηροφάγων στους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς αντανakλά την εναπόθεση σιδήρου στον πνευμονικό ιστό.¹⁹⁻²¹

Η κυτταρολογική εξέταση του εκπλύματος και η κατάδειξη με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων CD1a θετικών κυττάρων σε ποσοστό $\geq 5\%$ θέτει την διάγνωση της *ιστιοκυττάρωσης πνεύμονα*.^{1,3,5}

Τέλος, η εξέταση του BAL μπορεί να είναι εξαιρετικά διαφωτιστική στις περιπτώσεις λοιμώξεων, όπως η πνευμονοκύστη (Εικόνα 6).¹

Εξαιρουμένων των περιπτώσεων όπου η κυτταρολογική εξέταση του BAL είναι διαγνωστική, υπάρχει μακρύς κατάλογος παθήσεων του αναπνευστικού ή συστηματικών νόσων που προσβάλλουν τους πνεύμονες. Στις περιπτώσεις αυτές το BAL προσφέρει ουσιαστική βοήθεια στη διάγνωση, παρακολούθηση και εκτίμηση της ανταπόκρισης στην θεραπευτική αγωγή.^{1,5}

ΑΥΞΗΜΕΝΑ T- ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ BAL

Χρήσιμη προσέγγιση αποτελεί η κατάταξη των πνευμονικών παθήσεων με βάση τον τύπο λεμφοκυττάρων που ανευρίσκεται αυξημένος σε σχέση με τις τιμές αναφοράς.¹

1) Αύξηση CD4+ κυττάρων

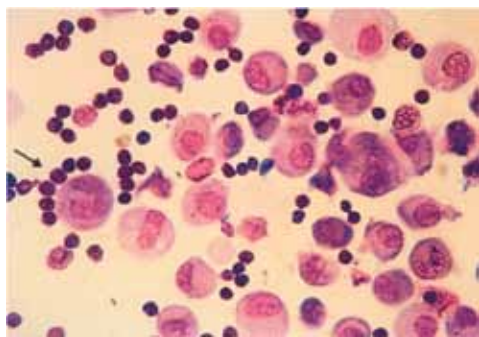
Στις σπάνιες περιπτώσεις εμφάνισης σαρκοείδωσης στην παιδική ηλικία, είναι αυξημένος ο ολικός αριθμός κυττάρων και ο απόλυτος αριθμός και το ποσοστό των λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων. Η αύξηση των λεμφοκυττάρων σχετίζεται με αύξηση στο πηλίκo CD4+/CD8+ κυττάρων. Είναι χαρακτηριστική η διάταξη των λεμφοκυττάρων δίκην ροζέτας (Εικόνα 7).^{21,22}

Οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, όπως η νόσος Crohn, αποτελούν την δεύτερη περίπτωση ανεύρεσης αυξημένου αριθμού λεμφοκυττάρων και ειδικά των CD4+.²³

2) Αύξηση CD8+ κυττάρων

Οι περιπτώσεις *πνευμονίτιδας από τοξική δράση φαρμάκων*, όπως τα κυτταροστατικά, χαρακτηρίζονται από αυξημένο ολικό αριθμό κυττάρων ανεξάρτητα από τον τύπο της πνευμονικής βλάβης που έχει προκληθεί (οξεία πνευμονική νόσος εξ υπερευαισθησίας, χρόνια πνευμονίτιδα-ίνωση και μη καρδιογενές πνευμονικό οίδημα). Στην οξεία πνευμονίτιδα επιπλέον παρατηρείται αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και του ποσοστού των CD8+ κατασταλτικών.²⁴

Στα παιδιά με *πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας* παρατηρείται αυξημένος αριθμός



Εικόνα 7. BAL από ασθενή με σαρκοείδωση. Χαρακτηριστική η κυτταρική διάταξη των λεμφοκυττάρων δίχην ροζέτας (βέλος).

λεμφοκυττάρων, αυξημένα T-φυσικά κυτταροκτόνα και μαστοκύτταρα (Εικόνα 8). Λόγω του μικρού αριθμού περιστατικών χρειάζονται περισσότερες μελέτες προκειμένου να διευκρινισθεί εάν ισχύουν τα δεδομένα των ενηλίκων όπου ο λόγος CD4+/CD8+ είναι μειωμένος λόγω αύξησης των CD8+ λεμφοκυττάρων.²⁵

Αυξημένος ανευρίσκεται ο αριθμός των ολικών λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων και στα υπόλοιπα διάμεσα νοσήματα. Στις περιπτώσεις διάμεσης πνευμονοπάθειας σε έδαφος αγγειίτιδας η εικόνα στο έκπλυμα εξαρτάται από τον τύπο της προσβολής (κυψελιδική αιμορραγία σε συ-

στηματικό ερυθματώδη λύκο, νόσο εξ εισροφίσεων σε δερματομυοσίτιδα). Ανεξάρτητα αυτών βρίσκουμε συχνά αυξημένο ποσοστό κατασταλτικών CD8+ λεμφοκυττάρων.^{11,26}

ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ ΣΤΟ BAL

Ο αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων στο έκπλυμα (Εικόνα 1) χαρακτηρίζει παθήσεις του πνευμονικού ιστού που αφορούν στους αεραγωγούς (άσθμα), το πνευμονικό παρέγχυμα (παρασιτικές λοιμώξεις, σύνδρομο Loeffler, οξεία ή χρόνια ηωσινοφιλική πνευμονία) και το πνευμονικό αγγειακό δίκτυο (σύνδρομο Churg-Strauss, ιδιοπαθές υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο). Η ανάλυση του BAL δείχνει πλην των αυξημένων ηωσινοφίλων, που σε περιπτώσεις όπως της ηωσινοφιλικής πνευμονίας μπορεί να ξεπερνούν το 40%, αυξημένες τιμές ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP), κυτταροκινών (PGE2, PGF2) και ιντερλευκινών IL-4 και IL-5. Παρόλα αυτά, για να τεθεί η διάγνωση μπορεί να χρειασθεί και βιοψία πνεύμονα.^{1,26}

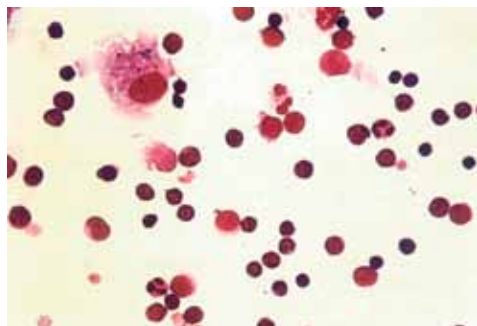
ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ ΣΤΟ BAL

Τα αυξημένα ουδετερόφιλα στο έκπλυμα είναι χαρακτηριστικό εύρημα σε υποκείμενη λοίμωξη (Εικόνα 2). Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν και άλλες καταστάσεις, όπως το άσθμα, οι διάμεσες πνευμονοπάθειες και η νόσος εξ εισροφίσεων όπου τα πολυμορφοπύρηννα μπορεί να είναι αυξημένα.^{1,27}

BAL και άσθμα

Η νόσος όπου συχνότερα παρατηρούνται αυξημένα ηωσινόφιλα στο BAL, αν και σε πολύ μικρότερους αριθμούς από εκείνους που απαντώνται στα ηωσινοφιλικά σύνδρομα, είναι το άσθμα.

Το παιδικό άσθμα χαρακτηρίζεται από



Εικόνα 8. BAL ασθενούς με εξωγενή κυψελιδίτιδα εξ υπερευαισθησίας με αυξημένη παρουσία μαστοκυττάρων στο έκπλυμα.

μεγάλη κλινική ετερογένεια που οδήγησε στην υιοθέτηση της υπόθεσης των διαφορετικών φαινότυπων. Οι φαινότυποι προέκυψαν από επιδημιολογικές μελέτες και αφορούν σε ομάδες παιδιών που μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά ως προς την ηλικία έναρξης των επεισοδίων, το βαθμό επηρεασμού της αναπνευστικής λειτουργίας, το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό ατοπίας. Φαίνεται ότι παιδιά που ανήκουν στον ίδιο φαινότυπο παρουσιάζουν κοινή εικόνα στην κυτταρολογική εξέταση του BAL.²⁸

Στους ασθενείς μικρής ηλικίας που εμφανίζουν διαλείπουσα συμπτωματολογία από το αναπνευστικό με επεισόδια συριγμού ήπιας βαρύτητας, με μεσοδιαστήματα ελεύθερα συμπτωμάτων, η εικόνα στο BAL (ολικός αριθμός κυττάρων, επιμέρους κυτταρικοί τύποι, μη κυτταρικά συστατικά, λόγος CD4/CD8) δε διαφέρει από εκείνη των μαρτύρων όταν το έκπλυμα ληφθεί μακριά από λοίμωξη.^{29,30} Αντίθετα, σε παιδιά ίδιας ηλικίας με συμπτώματα ασθματικού τύπου αυξημένης βαρύτητας ή/και συχνότητας, ο ολικός αριθμός κυττάρων στο BAL ανευρίσκεται αυξημένος, όπως και ο αριθμός ουδετερόφιλων, ποσοστιαία και σε απόλυτο αριθμό.²⁹⁻³¹

Η ουδετεροφιλική φλεγμονή είναι χαρακτηριστικό εύρημα στο έκπλυμα ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας με μέτριο ή σοβαρό άσθμα. Στα πλαίσια της διέγερσης των πολυμορφοπύρηνων και των εξ αυτών παραγόμενων ελευθέρων ριζών οξυγόνου επάγεται η οξειδωση πρωτεϊνών (αλβουμίνης, α1-αντιθρυψίνης, πρωτεΐνης Α του ΕΔΠ) στον αναπνευστικό βλεννογόνο και αυξάνονται οι τιμές ενζύμων όπως η μυελοϋπεροξειδάση.³⁰ Οι επιδράσεις αυτές σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο διαταράσσουν την διαδικασία επιδιόρθωσης βλαβών και κυτταρικής απόπτωσης (remodeling). Στα ίδια πλαίσια εκτίμησης της υποκείμενης ουδετεροφιλικής φλεγμονής μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP-9) που μειώνονται όταν μειώνεται η κυτταρική αποδόμηση.^{30,32}

Τα παιδιά που εμφανίζουν επίμονο συριγμό σε ατοπικό έδαφος έχουν αυξημένο αριθμό ηωσινοφίλων και επιθηλιακών κυττάρων.^{7,33} Η αύξηση των τελευταίων εξηγείται από την αυξημένη απόπτωση του επιθηλίου και δικαιολογεί την άποψη πολλών ερευνητών που υποστηρίζουν τη σημασία καταμέτρησης και υπολογισμού τους στον κυτταρικό τύπο στο BAL.^{4,7} Η ανεύρεση αυξημένου αριθμού ηωσινοφίλων βοηθάει στο διαχωρισμό των παιδιών που ανήκουν στον φαινότυπο του αλλεργικού άσθματος. Στο σύνδρομο μέσου λοβού, επιπλοκή που παρουσιάζεται συχνότερα στους ασθματικούς ασθενείς, ο αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων στο έκπλυμα συνδυάζεται με αυξημένη πιθανότητα κλινικής αλλά όχι απαραίτητα και ακτινολογικής βελτίωσης.³⁴

Η κυτταρολογική εικόνα στο BAL παιδιών με επίμονο ξηρό βήχα που η εμπειρική αντι-ασθματική αγωγή έχει ήδη δοκιμαστεί και αποτύχει, δεν διαφέρει από την ομάδα ελέγχου.^{4,35} Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την κλινική σύσταση για αποφυγή χορήγησης χρόνιας ρυθμιστικής αγωγής, αφού φαίνεται ότι κλινική εκδήλωση με διαφορετικό παθοφυσιολογικό υπόβαθρο.⁴

BAL και κυστική ίνωση

Η ινοβρογχοσκόπηση και το BAL αποτελούν βασική και απαραίτητη εξέταση μετά την διάγνωση της ΚΙ ακόμα και στις περιπτώσεις εκείνες που δεν υπάρχει αξιολογη συμπτωματολογία από το αναπνευστικό. Αξιοσημείωτος αριθμός ασθενών παρά τα ήπια αναπνευστικά συμπτώματα μπορεί να έχει λοίμωξη από σταφυλόκοκκο ή άλλα παθογόνα.³⁶

Το έκπλυμα στην ΚΙ χαρακτηρίζεται από αυξημένο ολικό αριθμό κυττάρων και ειδικά πολυμορφοπύρηνων, όπως επίσης λιποκυττάρων. Υπάρχει αυξημένη έκφραση κυτταρο-

κινών, όπως IL-8 από τα πρώτα στάδια της νόσου, καθώς επίσης ελαστάσης, μυελοϋπεροξειδάσης και άλλων μη κυτταρικών συστατικών δηλωτικών κυτταρικής αποδόμησης, όπως η μεταλλοπρωτεϊνάση (MMP-9) και οι γλυκοζαμινογλυκάνες.³⁶⁻³⁹

Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα αν στην φυσική πορεία της νόσου η φλεγμονή προηγείται της λοίμωξης ή το αντίθετο. Όπως φαίνεται από μελέτες ασθενών μικρής ηλικίας, στους οποίους η διάγνωση έγινε με δοκιμασία διαλογής (screening test) μετά την γέννηση χωρίς να έχουν ακόμα συμπτωματολογία από το αναπνευστικό και αρνητικές καλλιέργειες στο BAL, η λοίμωξη είναι εκείνη που επάγει την χρόνια φλεγμονή.^{4,37-39} Υπάρχουν ωστόσο πολλαπλοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου και οδηγούν στην δημιουργία βρογχεκτασιών, όπως τα χαμηλά επίπεδα των πρωτεϊνών του ΕΔΠ Α και D που συμμετέχουν στους αμυντικούς μηχανισμούς.³⁹

BAL και εισρόφηση

Η χρόνια είσοδος γαστρικού περιεχομένου ή τροφής στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα είναι συχνό πρόβλημα σε ειδικούς παιδιατρικούς πληθυσμούς και συνδυάζεται με επίμονη συμπτωματολογία ανθιστάμενη στην χορηγούμενη αγωγή. Υπάρχει δυσκολία στην ακριβή διάγνωση. Τα κυψελιδικά μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν το προϊόν της εισρόφησης γεγονός που αρχικά οδήγησε στην άποψη ότι η ανεύρεση ικανού αριθμού λιποκυττάρων είναι αναγκαία και ικανή συνθήκη για την διάγνωση των εισροφήσεων. Ωστόσο, αυξημένο ποσοστό λιποκυττάρων παρατηρείται στο BAL παιδιών με λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού γιατί κυψελιδικά μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης που απελευθερώνονται μετά την λύση των νεκρών κυττάρων. Εξάλλου αυξημένο ποσοστό λιποκυττάρων παρατηρούνται σε μεταβολικά νοσήματα όπως στις συγγενείς διαταραχές εναπόθεσης των λιπιδίων (νόσος Gaucher, Niemann-Pick). Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των λιποκυττάρων στο BAL σε συνδυασμό με την κλινική υποψία εισροφήσεων, τόσο αυξάνουν η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου.^{3,5,40}

Στο έκπλυμα παιδιών με πνευμονική νόσο εξ εισροφήσεων είναι αυξημένος ο αριθμός των πολυμορφοπύρηνων όπως και οι τιμές της ελαστάσης και της μυελοϋπεροξειδάσης. Η αυξημένη έκφραση της IL-8 εξηγεί τη χημειοταξία και συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων που παρατηρείται.⁴⁰

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ ΣΕ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΜΕΝΑ ΠΑΙΔΙΑ

Οι επιπλοκές από το αναπνευστικό είναι οι συχνότερες και σοβαρότερες που εμφανίζουν οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς εξ αιτίας των λοιμώξεων. Εκδηλώνονται σε παιδιά με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, κακοήθεις νόσους, σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ή πάσχουν από HIV. Η ινοβρογχοσκόπηση και το BAL αποτελούν πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο ακόμα και όταν έχει ήδη ξεκινήσει λόγω της κρισιμότητας της κατάστασης εμπειρική αντιμικροβιακή αγωγή.^{1,5}

Οι ενδείξεις για τη λήψη BAL στην ομάδα αυτή είναι οι ακόλουθες:

1. Οξεία έναρξη ταχύπνοιας, δύσπνοιας και υποξαιμίας με ακτινολογικά ευρήματα διάχυτων διάμεσων διηθήσεων του πνευμονικού παρεγχύματος.
2. Εντοπισμένη διήθηση στην ακτινογραφία χωρίς ανταπόκριση στην αγωγή.
3. Χρόνια διάμεση πνευμονίτιδα και ειδικά σε ασθενείς με λοίμωξη HIV.
4. Υποτροπιάζουσα βρογχοπνευμονία σε ασθενείς με AIDS
5. Έλεγχος πιθανής λοίμωξης ή απόρριψης πνευμονικού μολυσματικού.

Η κυτταρολογική εξέταση του BAL είναι πολύ υποβοηθητική συμβάλλοντας στην ταχύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς. Υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου ολικού αριθμού κυττάρων, των αυξημένων πολυμορφοπυρήνων και της θετικής καλλιέργειας. Η σχέση αυτή βοηθάει στην αποφυγή άσκοπης χρήσης αντιμικροβιακών στους μη ουδετεροπενικούς ασθενείς που η gram χρώση από το έκπλυμα είναι αρνητική εν αναμονή των καλλιιεργειών.

Το BAL δίνει πολύτιμες πληροφορίες και στους ασθενείς με AIDS όπου ανεξάρτητα από τον αυξημένο αριθμό λοιμώξεων παρουσιάζουν και άλλες επιπλοκές από τους πνεύμονες όπως είναι η διάμεση πνευμονίτιδα. Στις περιπτώσεις αυτές το BAL χαρακτηρίζεται από αυξημένο ολικό αριθμό κυττάρων, κυρίως λεμφοκυττάρων (λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα) και αυξημένη φιμπρονεκτίνη (ασθενείς θετικοί για πνευμονοκύστη).^{1,3,42,42}

Οι επιπλοκές της ινοβρογχοσκόπησης στα ανοσοκατασταλμένα παιδιά πιθανόν να είναι συχνότερες, χαρακτηρίζονται όμως ως ήπιας βαρύτητας και δεν εμποδίζουν την εύκολη απόφαση για την διενέργεια της βρογχοσκόπησης δεδομένου του οφέλους.^{1,5}

BAL ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ

Το BAL αποτελεί διαγνωστικό, θεραπευτικό αλλά και ερευνητικό εργαλείο. Στόχος είναι η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος και η αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των αναπνευστικών παθήσεων.

Η βλάβη στον πνευμονικό ιστό, όποιας προελεύσεως και φύσεως, αφορά άμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα που εκτός από αποδέκτες των «σημάτων» από κυτταρικά (μακροφάγα) και μη κυτταρικά συστατικά (κυτταροκίνες) αποτελούν και τους βασικούς ενόρχηστρωτές της διαδικασίας επιδιόρθωσης των τοξικών επιδράσεων. Οι κυψελίδες απαντούν στην διαδικασία με δομικές και λειτουργικές μεταβολές. Τα τελευταία χρόνια έχει υιοθετηθεί η άποψη ότι σημαντικό κομμάτι της λειτουργικής έκπτωσης που ακολουθεί μετά από μία βλάβη οφείλεται σε διαταραχές στους επισκευαστικούς μηχανισμούς.

Το BAL καθρεφτίζει το κυψελιδικό διαμέρισμα σε κυτταρικό και σε υποκυτταρικό επίπεδο και προσφέροντας τη δυνατότητα της εύκολης λήψης ή ακόμα και επανάληψης σε διαφορετικά στάδια της νόσου, δίνει απαντήσεις σε ερωτήματα που αφορούν στην παθογένεση των πνευμονικών νοσημάτων και στο χρόνο που γίνονται οι βλάβες. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται συμβάλλουν στην καταλληλότερη παρέμβαση, στο σωστό χρόνο, χωρίς κόστος και επιπλοκές για τον μικρό ασθενή.¹

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. de Blic J, Midulla F, Barbato A, Clement A, Dab I, Eber E, et al ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. Eur Respir J 2000; 15: 217-231.
2. Midulla F, de Blic J, Barbato A, Bush A, Eber E, Kotecha S, et al; ERS Task Force. Flexible endoscopy of paediatric airways. Eur Respir J 2003; 22: 698-708.
3. Τσακανίκα Κ. BAL: Εργαστηριακή αξιολόγηση. In: Διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες. Αθήνα: Εκδόσεις Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας; 2003. p. 153-160.
4. Connett GJ. Bronchoalveolar lavage. Paediatr Respir Rev 2000; 1: 52-56.
5. Balfour-Lynn I, Spencer H. Bronchoscopy- How and When? Paediatr Respir Rev 2002; 3: 255-264.

6. Koumbourlis AC, Kurland G. Nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage in mechanically ventilated infants: technique, efficacy, and applications. *Pediatr Pulmonol* 1993; 15: 257-262.
7. Najafi N, Demanet C, Dab I, De Waele M, Malfroot A. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatic children. *Pediatr Pulmol* 2003; 35: 302-308.
8. Pohunek P, Pokorna H, Striz I. Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thorax* 1996; 51: 615-618.
9. Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson CF. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 163-168.
10. Ratjen F, Bruch J. Adjustment of bronchoalveolar lavage volume to body weight in children. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 184-188.
11. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, et al. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 1986; 60: 532-538.
12. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J* 1994; 7: 1865-1870.
13. Midulla F, Villani A, Merolla R, Bjermer L, Sandstrom T, Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20: 112-118.
14. Braun J, Dalhof K, Ratjen F. Different protein composition of BALF in healthy children and adults. Technical and clinical implications. *Eur Respir J* 1994; 7: 228A.
15. Ratjen F, Kreuzfelder E. Differences in immunoglobulins and β_2 -microglobulin levels of bronchoalveolar lavage fluid between normal children and adults. *Lung* 1996; 174: 383-391.
16. Ratjen F, Rehn B, Costabel U, Brunch J. Age dependency of surfactant phospholipid and surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid children without bronchopulmonary disease. *Eur Respir J* 1996; 9: 328-333.
17. Priftis K, Mermiri D, Papadopoulou A, Anthracopoulos M, Vaos G, Nicolaidou P. The role of timely intervention in middle lobe syndrome in children. *Chest* 2005; 128: 2504-2510.
18. Wang B, Stern E, Schmidt RA, Pierson DJ. Diagnosing pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 1997; 111: 460-466.
19. Priftis KN, Anthracopoulos MB, Tsakanika C, Tapaki G, Ladis V, Bush A, et al. Quantification of siderophages in bronchoalveolar fluid in transfusional and primary pulmonary hemosiderosis. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 972-977.
20. Ioachimescu OC, Sieber S, Kotch A. Idiopathic pulmonary haemosiderosis revisited. *Eur Respir J* 2004; 24: 162-170.
21. Clement A; ERS Task Force. Task force on chronic interstitial lung disease in immunocompetent children. *Eur Respir J* 2004; 24: 686-669.
22. Milman N, Hoffmann AL. Childhood sarcoidosis: long-term follow-up. *Eur Respir J* 2008; 31: 592-598.
23. Bewig B, Manske I, Böttcher H, Bastian A, Nitsche R, Fölsch UR. Crohn's disease mimicking sarcoidosis in bronchoalveolar lavage. *Respiration* 1999; 66: 467-469.
24. Fauroux B, Meyer-Milsztain A, Boccon-Gibod L, Leverger G, Climent A, Biour M, et al. Cytotoxic drug-induced pulmonary disease in infants and children. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18: 347-355.
25. Ratjen F, Costabel U, Griesse M, Paul K. Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2003; 21: 144-148.
26. Ribeiro J, Fischer G. Eosinophilic lung diseases. *Paediatr Respir Rev* 2002; 3: 278-284.
27. Hilliard TN, Sukhani S, Francis J, Madden N, Rosenthal M, Balfour-Lynn I, et al. Bronchoscopy following diagnosis with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2007; 92: 898-899.
28. Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5: 155-161.
29. MacLennan C, Hutchinson P, Holdsworth S, Bardin PG, Freezer NJ. Airway inflammation in asymptomatic children with episodic wheeze. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 577-583.

30. Le Bourgeois M, Goncalves M, Le Clainche L, Benoist MR, Fournet JC, Scheinmann P, et al. Bronchoalveolar cells in children <3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest*. 2002; 122: 791-797.
31. Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? *Allergol Int* 2008; 57: 11-19.
32. Tang LF, Du LZ, Chen ZM, Zou CC. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in bronchoalveolar lavage cells of asthmatic children. *Fetal Pediatr Pathol* 2006; 25: 1-7.
33. Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A. Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 42-44.
34. Priftis KN, Anthracopoulos MB, Mermiri D, Papadopoulou A, Xepapadaki P, Tsakanika C, et al. Bronchial hyperresponsiveness, atopy, and bronchoalveolar lavage eosinophils in persistent middle lobe syndrome. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 805-811.
35. Ferreira Fde A, Filho LV, Rodrigues JC, Bush A, Haslam PL. Comparison of atopic and nonatopic children with chronic cough: bronchoalveolar lavage cell profile. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 857-863.
36. Marguet C, Jouen Boedes F, Warner JO. Bronchoalveolar cell profile in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1533-1540.
37. Armstrong DS, Hook SM, Jansen KM, Nixon GM, Carzino R, Carlin JB, et al. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 2005; 40: 500-510.
38. Reinhardt N, Chen CI, Loppow D, Schink T, Kleinau I, Jørres RA, et al. Cellular profiles of induced sputum in children with stable cystic fibrosis: comparison with BAL. *Eur Respir J*. 2003; 22: 497-502.
39. Noah TL, Murphy PC, Alink JJ, Leigh MW, Hull WM, Stahlman MT, et al. Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 685-691.
40. Kazachkov MY, Muhlebach MS, Livasy CA, Noah TL. Lipid-laden macrophage index and inflammation in bronchoalveolar lavage fluids in children. *Eur Respir J* 2001; 18: 790-795.
41. Efrati O, Gonik U, Bielei B, Modan-Moses D, Toren A. Fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage for the evaluation of pulmonary disease in children with primary immunodeficiency and cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 324-329.
42. Midulla F, Strappini P, Sandstrom T, Bjermer L, Falasca C, Ronchetti R. Cellular and noncellular components of bronchoalveolar lavage fluid in HIV-1-infected children with radiological evidence of interstitial lung damage. *Pediatr Pulmonol* 2001; 31: 205-213.

Αναζήτηση ιών στο κατώτερο αναπνευστικό

Χ. Σκευάκη, Ν. Παπαδόπουλος

Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού αποτελούν μείζον πρόβλημα υγείας με σημαντικό κόστος και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως. Η ανίχνευση ιών στο κατώτερο αναπνευστικό αποσκοπεί στην επιβεβαίωση ή στον αποκλεισμό συγκεκριμένης αιτιολογίας αναπνευστικής νόσου προκειμένου να συμπληρωθεί και να υποστηριχθεί η κλινική διάγνωση. Παράλληλα, κατευθύνει την χορηγούμενη αγωγή ενώ αποτελεί απαραίτητο εργαλείο επιδημιολογικών μελετών.

Οι ιοί του αναπνευστικού ανιχνεύονται με μία ή συνδυασμό εργαστηριακών μεθόδων, που περιλαμβάνουν την άμεση επισκόπηση του ιού, την ανίχνευση γενετικού υλικού ή πρωτεϊνών του ιού, την καλλιέργεια σε κατάλληλο ξενιστή, καθώς και τις ορολογικές δοκιμασίες. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από τις συνθήκες και το σκοπό της ανάλυσης, όπως την ύπαρξη κατάλληλου εργαστηριακού εξοπλισμού και καταρτισμένου προσωπικού, τη σχέση κόστους-οφέλους καθώς και την ανάγκη για άμεσο αποτέλεσμα. Στις μέρες μας, μοριακές τεχνικές, όπως αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) έχουν σταδιακά αντικαταστήσει την τεχνολογία του ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), που χρησιμοποιήθηκε ευρέως από τη δεκαετία του 1980. Τα διαγνωστικά ιολογικά εργαστήρια δίνουν πλέον ιδιαίτερη έμφαση στην διαθεσιμότητα ταχέων μεθόδων ανίχνευσης, στην αναγνώριση νέων ιών, στην ανάπτυξη αντι-ιικής ανθεκτικότητας, καθώς και στον αυξημένο αριθμό ευκαιριακών ιογενών λοιμώξεων.

Το κεφάλαιο αυτό αποσκοπεί στη συνοπτική παρουσίαση παραδοσιακών μεθόδων διάγνωσης και την υπογράμμιση νεότερων τεχνικών που αποτελούν επιλογές αναφοράς για την ανίχνευση της πλειονότητας των ιών στο κατώτερο αναπνευστικό.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΣΙΑ

Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή εφαρμογή μίας διαγνωστικής μεθόδου αποτελεί η κατάλληλη συλλογή, μεταφορά και συντήρηση των κλινικών δειγμάτων. Η δειγματοληψία κατά τις πρώτες μέρες των συμπτωμάτων οδηγεί συνήθως σε υψηλότερα ποσοστά απομόνωσης των ιών.

Η μέθοδος των προκλητών πτυέλων μειονεκτεί σε σχέση με δείγματα που λαμβάνονται κατευθείαν από τους βρόγχους, λόγω της υψηλής συχνότητας επιμόλυνσης με την στοματοφαρυγγική χλωρίδα και ύπαρξης βακτηρίων, τα οποία εμποδίζουν την ανάπτυξη των ιών. Χρησιμοποιείται συχνά, καθώς είναι η ευκολότερη. Η καλλιέργεια των ιών και η

άμεση ανοσοανίχνευσή τους πραγματοποιείται με μεγαλύτερη επιτυχία σε ίζημα κυττάρων που προέρχεται από διατραχειακές αναρροφήσεις, βρογχικές αναρροφήσεις και βρογχικές βιοψίες. Η απομόνωση και η ανοσοφθορίζουσα ανίχνευση των ιών του αναπνευστικού μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ίζημα και το υπερκείμενο βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (bronchoalveolar lavage, BAL).¹

Οι πνευμονικές βιοψίες αποτελούν κατάλληλο υλικό για την ανίχνευση ιών του αναπνευστικού με ηλεκτρονική μικροσκόπηση. Δείγματα (BAL) που προορίζονται για μικροσκόπηση δεν ενδείκνυται να αραιώνονται με μεταφορικό μέσο ιών (viral transport medium, VTM), καθώς τα άλατα και οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο VTM επηρεάζουν το πεδίο μικροσκόπησης, ενώ παράλληλα αραιώνουν τα ιικά σωματίδια. Αντίθετα, κρίνεται απαραίτητη η συμπύκνωση του BAL, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω υπερφυγοκέντρωσης, υπερδιήθησης ή διάχυσης σε άγαρ. Η συμπύκνωση του ιού μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, ενώ τεχνικές ανοσοκαθίζησης είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην ανίχνευση των πικόρναϊών, λόγω του εξαιρετικά μικρού τους μεγέθους. Βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ιών *in vitro* και συλλογή υπερκειμένων πριν από την εμφάνιση κυτταροπαθητικής επίδρασης (cytopathic effect, CPE) αποτελούν μία επιπλέον εναλλακτική μέθοδο εμπλουτισμού ενός δείγματος, το οποίο περιέχει πολύ λίγα ιικά σωματίδια για μικροσκόπηση.¹

Δείγματα, τα οποία προορίζονται για PCR διατηρούνται στους -70 °C προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η αποδόμηση του γενετικού υλικού. Για τον ίδιο λόγο, φιαλίδια, διαλύματα και ρυθμιστικά μέσα, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη μεταφορά και επεξεργασία των δειγμάτων θα πρέπει να είναι ελεύθερα ριβονουκλεασών, ενώ η μεταφορά θα πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατόν. Τέλος, η ηπαρίνη αντενδεικνύεται για δείγματα αίματος διότι αναστέλλει την αντίδραση PCR.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργειες ιών

Ιστορικά, οι ιοί καλλιεργούνταν σε πειραματόζωα και γόνιμα αυγά, ενώ πλέον οι περισσότερες τεχνικές βασίζονται σε κυτταρικές σειρές. Πρόκειται για ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική μέθοδο με την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιούνται τα κατάλληλα υλικά και η αρχική διάγνωση, που βασίζεται σε χαρακτηριστική CPE, επιβεβαιώνεται στη συνέχεια με ανοσοχρώση. Η παρατηρούμενη CPE αντιπροσωπεύει εκφυλιστικές αλλοιώσεις και μπορεί να πάρει τη μορφή συγκυτίων, κενोटόπιων, κοκκιώδους εκφύλισης, στρογγυλοποίησης και αποκόλλησης.

Ο τίτλος του εναιωρήματος των ιών αποτιμάται είτε με την δόση που προκαλεί CPE στο 50% των ενοφθαλμισμένων κυττάρων είτε με τον αριθμό των περιοχών νεκρών κυττάρων που σχηματίζονται όταν το κυτταρικό στρώμα αναπτύσσεται καλυμμένο από στερεό μέσο που περιέχει άγαρ. Ακόμη, ιοί του αναπνευστικού που εκφράζουν αιμοσυγκολλητίνες (π.χ. ο ιός της γρίπης) μπορούν να αποτιμηθούν χάρη στην ικανότητα τους να προσκολλώνται σε ερυθροκύτταρα και να σχηματίζουν συστάδες σε καλλιεργητικά μέσα.

Σε αντίθεση με μεθόδους που ανιχνεύουν ιικό αντιγόνο ή γονιδίωμα, η δυνατότητα καλλιέργειας ιού από κλινικό δείγμα αποδεικνύει την παρουσία βιώσιμου ιού. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι στελέχη τα οποία απομονώνονται με αυτόν τον τρόπο μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω αναλύσεις, όπως δοκιμασίες τυποποίησης και ευαισθησίας σε αντι-ιικά φάρμακα, να παράσχουν πληροφορίες για επιδημιολογικούς σκοπούς αλλά και να βοηθήσουν στην αναγνώριση νέων ιών.

Ο ρόλος της συμβατικής κυτταροκαλλιέργειας στην τυποποιημένη διάγνωση ιογενών

λοιμώξεων φαίνεται να αμφισβητείται τα τελευταία χρόνια καθώς απαιτεί σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα για την έκδοση των αποτελεσμάτων (μέρες έως και εβδομάδες) και υψηλό αριθμό απασχολούμενων ατόμων. Μία σειρά από τροποποιήσεις της συμβατικής μεθόδου έχουν προταθεί έτσι ώστε να μειωθεί σημαντικά ο χρόνος που απαιτείται. Αυτές περιλαμβάνουν φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε κυτταρικά στρώματα και ανοσοχρώση με ειδικά για πρωτεΐνες του ιού αντισώματα. Επιπλέον, παράλληλες καλλιέργειες περισσότερων κυτταρικών σειρών αυξάνουν συνεργικά την ευαισθησία της μεθόδου.²

Ηλεκτρονική μικροσκόπηση

Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι η μόνη μέθοδος που επιτρέπει την άμεση επισκόπηση των ιών και γι' αυτό έχει επιπλέον εφαρμογές πέραν της αμιγούς διάγνωσης. Η προετοιμασία των δειγμάτων και η τεχνική της αρνητικής χρώσης είναι σχετικά απλές και γρήγορες διαδικασίες, ενώ η μέθοδος της μικροσκόπησης θεωρείται από τις πιο οικονομικές διαγνωστικές επιλογές. Επιπλέον, μπορεί να ανιχνεύσει ιούς που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν και χρησιμοποιείται ευρέως κατά την διάρκεια επιδημίας αγνώστου αιτιολογίας. Ωστόσο, το όριο ευαισθησίας είναι κατά προσέγγιση 10^6 ιικά σωματίδια/ml, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευση μετά τις πρώτες μέρες της λοίμωξης όπου η ιοφορία μειώνεται κάτω από αυτό το όριο.³ Ακόμη, η ηλεκτρονική μικροσκόπηση απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, κατάλληλα καταρτισμένο προσωπικό και είναι προσαρμόσιμη σε παραλλαγές, οι οποίες αυξάνουν την ευαισθησία της.

Οι πικόρνα- και οι αδενοϊοί χαρακτηρίζονται από εικοσαεδρική συμμετρία και φαίνονται στρογγυλοί στο μικροσκόπιο.⁴ Οι αδενοϊοί, σε αντίθεση με τους πικορναϊούς, είναι σχετικά μεγάλοι σε μέγεθος, ενώ μπορεί να εκφυλιστούν σε εξαγωνιαία δίκτυα που σχηματίζονται από μεμονωμένα καψομερίδια. Αναπνευστικοί ιοί που περιβάλλονται από φάκελο, όπως ο ιός της γρίπης, της παραγρίπης και οι κορόνα ιοί διακρίνονται από τις εξωτερικές τους προεξοχές αλλά η διάκριση μεταξύ ορθο- και παραμυξοϊών παραμένει δύσκολη. Περαιτέρω πληροφορίες για την ταυτότητα ενός ιού παρέχονται από την εμφάνιση του νουκλεοκαψιδίου (μέγεθος, σχήμα) και την ενδοκυτταρική θέση (πυρήνας, κυτταρόπλασμα).¹

Αντιγονικές δοκιμασίες

Οι αντιγονικές δοκιμασίες βασίζονται στην υπόθεση ότι υπάρχει ένας συγκεκριμένος ιός σε ένα δείγμα και δεν επιτρέπουν την ανακάλυψη καινούργιων στελεχών. Πρόκειται για ταχείες και ειδικές δοκιμασίες με ιδιαίτερη χρησιμότητα στην επιτήρηση επιδημιών. Οι δοκιμασίες περιλαμβάνουν τον άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό (immunofluorescence, IF), τον ραδιοανοσολογικό (radioimmunoassay, RIA), ενζυμικό ανοσολογικό (enzyme immunoassay, EIA), φθορίζοντα ανοσολογικό (fluoroimmunoassay, FIA) και οπτικό ανοσολογικό (optical immunoassay, OIA) προσδιορισμό, καθώς και δοκιμασίες συγκόλλησης.

Η IF επιτρέπει την ταυτόχρονη ταχεία (σε 1-2 ώρες) ανίχνευση περισσότερων του ενός ιών σε ένα κλινικό δείγμα. Βασίζεται στην χημική συνένωση ενός φθοριοχρώματος με ένα αντισώμα και αποτιμάται με την χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου. Η έμμεσος IF είναι πιο ευαίσθητη αλλά λιγότερο ειδική τεχνική σε σχέση με την άμεσο IF. Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων IF είναι σε ένα βαθμό υποκειμενική και εξαρτάται από την εμπειρία και την κατάρτιση του εξεταστή.³

Η RIA διακρίνεται σε ανταγωνιστική και μη ανταγωνιστική. Στην πρώτη μία γνωστή ποσότητα ραδιοσημασμένου αντιγόνου ανταγωνίζεται με το μη σημασμένο αντιγόνο, το

οποίο προστίθεται (δείγμα υπό δοκιμή). Αντίθετα, η μη ανταγωνιστική RIA είναι οικονομικότερη τεχνική που χρησιμοποιεί σημασμένα αντισώματα αντί για ιικά αντιγόνα και για τον λόγο αυτό είναι περισσότερο δημοφιλής στην διαγνωστική ιολογία. Παραλλαγές της RIA αποτελούν η άμεσος και έμμεσος sandwich RIA.

Η EIA βασίζεται στη σύνδεση κατάλληλων ενζύμων με αντισώματα και τη χρήση τους για ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση αντιγόνων. Τα τελικά προϊόντα της EIA είναι διαλυτά έγχρωμα συμπλέγματα ή αδιάλυτα υποστρώματα εμφανή με γυμνό μάτι, οπτικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ή μπορούν να αποτιμηθούν με φασματοφωτόμετρο.

Η χρήση συσκευών αποτύπωσης κηλίδας επιτρέπουν την ανίχνευση πολλών διαφορετικών αναπνευστικών ιών από πολλά δείγματα σε νιτροκυτταρίνη ή μεμβράνες nylon (cassette EIA) αλλά η ευαισθησία πιθανόν να μην επαρκεί.

Σε πρωτόκολλα OIA, τα ειδικά για τον ιό αντισώματα μονιμοποιούνται σε λεπτό μοριακό φιλμ και εκτίθενται σε ιικά αντιγόνα. Έπειτα από σύντομη επώαση, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα και στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος αναπτύσσεται έγχρωμη κηλίδα, που επιτρέπει την ανίχνευση του RSV ή του ιού της γρίπης σε 15 min χωρίς τη χρήση περίπλοκου εξοπλισμού. Τέλος, η δοκιμασία συγκόλλησης με latex είναι σχετικά απλή και παρέχει αποτελέσματα σε ~15 min αλλά έχει χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα.⁵

Τεχνικές βασιζόμενες στην ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος

Οι επικρατέστερες και ταχύτερα αναπτυσσόμενες μέθοδοι ανίχνευσης ιών του αναπνευστικού βασίζονται στο γενετικό υλικό του ιού (DNA ή RNA) και την αναγνώρισή του με τεχνικές σχετικές με την PCR. Η ευαισθησία, ειδικότητα, αξιοπιστία και ακρίβεια αυτών των τεχνικών είναι σαφώς ανώτερες από τις υπόλοιπες μεθόδους που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο. Στις μέρες μας, ένα πλήθος από εμπορικά τυποποιημένα αντιδραστήρια και αυτοματοποιημένα συστήματα είναι διαθέσιμα, τα οποία βελτιστοποιούν τον έλεγχο ποιότητας και την ποικιλότητα ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια.

RT-PCR

Για τους περισσότερους ιούς του αναπνευστικού (με εξαίρεση τον αδενοϊό, που είναι DNA ιός), μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού (total RNA extraction) απαιτείται ένα επιπλέον βήμα αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) προκειμένου να υποβληθεί το δείγμα σε ανάλυση PCR. Κατά την ανάλυση αυτή, μία DNA πολυμεράση, ανθεκτική σε θερμότητα, επεκτείνει εκκινητές (primers) ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικούς στο ιικό cDNA. Συνεχείς κύκλοι αποδιάταξης, αναδιάταξης και επέκτασης καταλήγουν σε μία εκθετική συσσώρευση του στόχου DNA. Η αντίδραση περιορίζεται μόνο από την διαθεσιμότητα υποστρώματος (νουκλεοτιδίων) και τον πιθανό ανταγωνισμό μεταξύ του γονιδιώματος στόχου και άλλων amplicons για τα συστατικά της αντίδρασης. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε гέλη αгарόζης 1-2,5% και φαίνεται ως δέσμη DNA υπό UV ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο εθίδιο ή άλλη χρωστική DNA. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου⁶ ή να γίνει διάκριση ανάμεσα σε διαφορετικούς ορότυπους του ίδιου ιού, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR μπορεί να υποβληθεί σε ένα δεύτερο γύρο PCR με εσωτερικούς (ως προς αυτούς του πρώτου γύρου) εκκινητές (nested PCR) ή σε υβριδισμό με ένα σημασμένο ανιχνευτή νουκλεϊκού οξέος (π.χ. με Southern blot). Η nested PCR μπορεί να ανιχνεύει έως και λίγα ιικά σωματίδια,⁷ ενώ διάκριση εντός ή μεταξύ γενών μπορεί να

επιτευχθεί και με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών στα προϊόντα της PCR όπως στην περίπτωση της BglII, η οποία μπορεί να διαχωρίσει τους ανθρώπινους ρινοϊούς από τους εντεροϊούς.⁸

Η πολλαπλή (multiplex) PCR χρησιμοποιεί μείγμα από ζεύγη εκκινητών ούτως ώστε να μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα πολλούς διαφορετικούς ορότυπους ιών σε ένα κλινικό δείγμα. Ωστόσο, κάθε ζεύγος εκκινητών απαιτεί διαφορετικές συνθήκες για βέλτιστη ενίσχυση του γονιδιακού στόχου, οπότε χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την ανάπτυξη μίας multiplex PCR. Τα όρια ανίχνευσης σχετικών πρωτοκόλλων επιτρέπουν την αναγνώριση ελάχιστων ιικών αντιγράφων ~100-140/ml. Ακόμη, συνδυασμοί multiplex PCR με την μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσοροφητικού προσδιορισμού έχουν διαφορετική ευαισθησία για καθένα από τους ιούς στους οποίους στοχεύουν. Ημιοσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι εφικτή με κατάλληλο εξοπλισμό⁹ και συστήματα που ανιχνεύουν έως και 19 μικροοργανισμούς σε δείγματα⁶ ή διακρίνουν ανάμεσα στους πολλούς διαφορετικούς ορότυπους πικόρναϊών¹⁰ ή αδενοϊών¹¹ έχουν περιγραφεί. Κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο, ο συνδυασμός multiplex PCR και άμεσου ανοσοφθορισμού θεωρείται ως η πλέον αξιόπιστη και οικονομική μέθοδος για την ανίχνευση αναπνευστικών ιών.¹²

Πολλές εφαρμογές που βασίζονται στην τεχνολογία PCR εμπλουτίζουν τις γνώσεις μας στην βιολογία και λειτουργία των αναπνευστικών ιών. Η ανάλυση της αλληλουχίας των amplicons ή η κλωνοποίηση ιικών γονιδιακών τμαχίων με αλληλοεπικαλυπτόμενους ή εκφυλισμένους εκκινητές μέσα σε πλασμίδια βακτηρίων επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό άγνωστων ιικών στελεχών. Επίσης, η *in situ* PCR επιτρέπει τον κυτταρικό εντοπισμό του ιικού υλικού σε ιστικές τομές.

Real time PCR

Η PCR πραγματικού χρόνου (real time) υπερέρχει συγκριτικά με την συμβατική PCR, την κυτταροκαλλιέργεια και τον ανοσοφθορισμό για την ανίχνευση ιών του αναπνευστικού¹³ σε κλινικά δείγματα κυρίως διότι είναι ποσοτική. Η μέθοδος χρησιμοποιεί είτε φθορίζουσα χρωστική (SYBR Green I), που μπορεί να προσδένεται σε διπλή αλυσίδα DNA ή ένα πιο ειδικό σημασμένο ζεύγος εκκινητών ή ανιχνευτές υβριδισμού (TaqMan, Molecular Beacons, Light Cycler Systems) για την αποτίμηση της παρουσίας και της ποσότητας των amplicons. Για την ποσοτική ανάλυση και την εκτίμηση των ορίων ανίχνευσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν διαδοχικές αραιώσεις πλασμιδιακού DNA που περιέχει γνωστή ποσότητα ιικού γονιδιώματος ως ένα πρότυπο διάλυμα αναφοράς. Έως σήμερα, για την ανίχνευση αναπνευστικών ιών έχουν αναπτυχθεί συστήματα real time PCR ενός ή δύο κύκλων, καθώς και multiplex μοντέλα, όπου τα probes είναι σημασμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα, με αρκετά μεγάλη ευαισθησία.¹⁴⁻¹⁶ Παρόλα αυτά, οι περισσότερες συσκευές δεν επιτρέπουν την ταυτόχρονη χρήση περισσότερων των δύο φθοριοχρωμάτων ενώ η πιο σύγχρονη πλατφόρμα έχει κατορθώσει να ανιχνεύσει τέσσερις διαφορετικές χρωστικές.

In situ υβριδισμός

Η τεχνική του υβριδισμού απαιτεί την παρουσία μονής αλυσίδας RNA ή DNA κι έτσι οι ιοί του αναπνευστικού, που στην πλειονότητά τους διαθέτουν μονή αλυσίδα RNA ως γενετικό υλικό, αποτελούν κατάλληλη πηγή. Για τον αδενοϊό, που περιέχει διπλή έλικα DNA, το μόριο αυτό θα πρέπει πρώτα να αποσυνδεθεί με χημικό (π.χ. NaOH) ή φυσικό (θερμότητα) τρόπο. Κατά τον υβριδισμό, ένα ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο μοιράζεται κάποιου βαθμού

ομολογία με τη μονή αλυσίδα ιικού νουκλεϊκού οξέος, χρησιμοποιείται υπό αυστηρές συνθήκες αντίδρασης. Το ολιγονουκλεοτίδιο μπορεί να σημανθεί απευθείας με ένζυμα ή άλλα μόρια αναφοράς ή να συνδεθεί με βιοτίνη ή διγοξιγενίνη, τα οποία δρουν ως γέφυρες για την σύνδεση άλλων μορίων αναφοράς. Ο υγρός υβριδισμός επιτρέπει την ανίχνευση ιών σε διαλύματα ενώ ο υβριδισμός *in situ* γίνεται σε κύτταρα ή ιστό, τα οποία περιέχουν τον ιό και έχουν μονιμοποιηθεί σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Άλλες τεχνικές υβριδισμού περιλαμβάνουν το dot-blot και το Southern blot πρωτόκολλο. Ο RNA υβριδισμός έχει δείχτει να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από τις δοκιμασίες αιμοσυγκόλλησης όσον αφορά στην ανίχνευση του πολλαπλασιασμού του ιού της γρίπης σε καλλιέργεια.¹⁷ Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο υβριδισμός υπερτερεί έναντι της PCR ως προς την ανίχνευση αναπνευστικού ιού στους αεραγωγούς.¹⁸

Ορολογικές μέθοδοι

Όλες οι ιογενείς λοιμώξεις οδηγούν σε μία αντισωματική απάντηση και ο ορός κατά την οξεία φάση της λοίμωξης (<1 εβδομάδα) αλλά και κατά την αποδρομή (>2 εβδομάδες) είναι το δείγμα επιλογής στις περισσότερες σχετικές δοκιμασίες, αν και κλινικά δείγματα όπως πτύελα και ούρα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν. Πρόκειται για μία ταχεία, αυτοματοποιημένη μέθοδο και το ίδιο ευαίσθητη όσο και η PCR όσον αφορά συγκεκριμένους ιούς.¹⁹ Επίσης, προτιμάται στις περιπτώσεις όπου οι αντιγονικές μέθοδοι είναι ανεπαρκείς (π.χ. στην ανίχνευση RSV σε ενήλικους), αντενδεικνύεται σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ενώ αποτελεί μέθοδο εκλογής για επιδημιολογικές μελέτες, όπου τα αποτελέσματα εκτιμώνται αναδρομικά. Οι κύριοι τρόποι ορολογικής ανίχνευσης ενός αναπνευστικού ιού είναι με ανοσολογικό προσδιορισμό, με δοκιμασίες σύνδεσης συμπληρώματος και παθητικής συγκόλλησης καθώς και με δοκιμασίες αναστολής συγκόλλησης. Στις μεθόδους ανοσολογικού προσδιορισμού (π.χ. EIA, RIA, IF), μολυσμένα με ιό κύτταρα ή ιικά αντιγόνα μονιμοποιούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και επωάζονται με τον ορό των ασθενών. Οι δοκιμασίες σύνδεσης συμπληρώματος θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητες για την ανίχνευση ιών του αναπνευστικού σε ανθρώπινα δείγματα και βασίζονται στο γεγονός ότι πρωτεΐνες του συμπληρώματος συνδέονται στα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος κατά την ανοσιακή απόκριση του ξενιστή σε ένα αντιγόνο. Εάν το αντιγόνο βρίσκεται ενδοκυτταρικά, η εναπόθεση συμπληρώματος προκαλεί κυτταρική λύση. Η αρχή λειτουργίας της δοκιμασίας αναστολής της αιμοσυγκόλλησης βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ιικών πρωτεϊνών (π.χ. αιμοσυγκολλητίνη, HA) να συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς επιφανείας των ερυθροκυττάρων και να προκαλούν την συγκόλληση των τελευταίων ενώ αποτελεί αξιόπιστη επιλογή για πρωτόκολλα επιτήρησης γρίπης.⁶

Αναπτυσσόμενες τεχνικές

Οι περισσότερες αναπτυσσόμενες τεχνικές χρησιμοποιούν προηγμένες μεθόδους μοριακής βιολογίας μόνες ή σε συνδυασμό με άλλες τεχνολογίες προκειμένου να βελτιώσουν την επίδοση των ήδη υπάρχοντων διαγνωστικών μεθόδων ή να διευρύνουν την πληροφορία που παρέχεται από ένα δεδομένο διαγνωστικό πρωτόκολλο. Έτσι, συνδυασμός υβριδισμού με ηλεκτροφωταύγεια ή η χρήση μοριακών δεσμών είναι ικανά να ανιχνεύουν ακόμη και ελάχιστα σωματίδια του ιού της παραγρίπης.²⁰ Άλλες τεχνικές, όπως η real-time loop mediated amplification (LAMP),²¹ η nucleic acid sequence-based amplification (NASBA),²² καθώς και η ασύμμετρη πολλαπλή PCR σε συνδυασμό με microarray υβριδισμό,²³ έχουν

δείξει παρόμοια ευαισθησία με την συμβατική real time PCR ως προς την ικανότητα ανίχνευσης ιών του αναπνευστικού. Επίσης, η χρήση περιοριστικών ενζύμων σε διπλή έλικα cDNA, η οποία έχει μεταγραφεί από ιϊκό RNA (cDNA-amplified restriction fragment length polymorphism), αλλά και 3'έκφυλισμένων εκκινητών σε μία τυχαιοποιημένη PCR επιτρέπουν την ενίσχυση του ιϊκού γενετικού υλικού οποιουδήποτε ιού σε κλινικό δείγμα ασθενών με αναπνευστική νόσο αγνώστου αιτιολογίας.

Στις μέρες μας, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) είναι από τις πιο ευαίσθητες και αποδοτικές επιλογές για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών διαφορετικών ιϊκών στελεχών (>100) ή ορότυπων συγκεκριμένου ιού.²⁴ Άλλος συνδυασμός, που χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση του γονιδιώματος του SARS²⁵ είναι η χρήση μοριακών δεσμών συνδεδεμένων με μικροσφαιρίδια, τα οποία μπορούν να ανιχνεύουν πολλαπλά νουκλεϊκά οξέα σε διάλυμα, ακολουθούμενη από συμβατική κυτταρομετρία ροής. Τέλος, τεχνικές που δεν χρησιμοποιούν σήμανση, όπως η surface plasmon resonance, η quartz crystal microbalance και τα χρωματομετρικά λειτουργικά πολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άμεση ανίχνευση αναπνευστικών ιών.²⁶

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

Η αναγνώριση συγκεκριμένων ιών στις λοιμώξεις του αναπνευστικού δεν έχει ακόμη φτάσει στο μέγιστο της αξίας της, δεδομένου ότι οι δυνατότητες ειδικής αντιμετώπισης και θεραπείας των ιών είναι σχετικά περιορισμένες. Ανάμεσα στους ιούς για τους οποίους υπάρχει τέτοια δυνατότητα, σημαντικότερος ίσως είναι ο ιός της γρίπης, σε όλες τις ηλικίες. Σε βρέφη και νεογνά, η ανίχνευση του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και του αδενοϊού μπορεί να επηρεάσει τους θεραπευτικούς χειρισμούς και την πρόγνωση. Επίσης, η ανίχνευση άτυπων βακτηριδίων, τα οποία ανιχνεύονται παράλληλα και με άλλες μεθόδους μπορεί να βοηθήσει σε επιλογή της κατάλληλης αγωγής. Εκτός από ερευνητικό ενδιαφέρον, η αναγνώριση άλλων παθογόνων έχει και κλινικό λόγω της βοήθειας που προσφέρει στη διαφορική διαγνωστική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Psarras S, Papadopoulos NG, Johnston SL. Diagnosis of viral respiratory illness: practical applications. In: Chernick V, Boat TF, Wilmott RW, Bush. A, (editors). Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children. 7th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2006.
2. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. J Clin Microbiol 2004; 42: 79-82.
3. Jeffery K, Pillay D. Diagnostic approaches. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD (editors). Principles and practice of clinical virology. 5th ed. Chichester: Wiley; 2004. p. 1-21.
4. Papadopoulos NG, Skevaki CL. Respiratory Viruses. In: Laurent G, Shapiro S (eds), Encyclopedia of Respiratory Medicine Oxford: Elsevier; 2006.
5. Grandien M. Viral diagnosis by antigen detection techniques. Clin Diagn Virol 1996; 5: 81-90.
6. Zambon M, Hays J, Webster A, Newman R, Keene O. Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. Arch Intern Med 2001; 161: 2116-2122.
7. Myatt TA, Johnston SL, Rudnick S, Milton DK. Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet

- irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. *BMC Public Health* 2003; 3: 5.
8. Papadopoulos NG, Hunter J, Sanderson G, Meyer J, Johnston SL. Rhinovirus identification by BglII digestion of picornavirus RT-PCR amplicons. *J Virol Methods* 1999; 80: 179-185.
9. Chi XS, Li F, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Semiquantitative one-step RT-PCR for simultaneous identification of human influenza and respiratory syncytial viruses. *J Virol Methods* 2007; 139: 90-92.
10. Weigl JA. <http://pid-ari.net/#>
11. Billaud G, Peny S, Legay V, Lina B, Valette M. Detection of rhinovirus and enterovirus in upper respiratory tract samples using a multiplex nested PCR. *J Virol Methods* 2003; 108: 223-228.
12. Adhikary AK, Inada T, Banik U, Numaga J, Okabe N. Identification of subgenus C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 670-673.
13. Dagher H, Donninger H, Hutchinson P, Ghildyal R, Bardin P. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods* 2004; 117: 113-121.
14. Ng LF, Wong M, Koh S, Ooi EE, Tang KF, Leong HN, et al. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus in blood of infected patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 347-350.
15. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 981-986.
16. Boivin G, Cote S, Dery P, De Serres G, Bergeron MG. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 45-51.
17. Rimmelzwaan GF, Baars M, Claas EC, Osterhaus AD. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *J Virol Methods* 1998; 74: 57-66.
18. Pitkaranta A, Puhakka T, Makela MJ, Ruuskanen O, Carpen O, Vaheri A. Detection of rhinovirus RNA in middle turbinate of patients with common colds by in situ hybridization. *J Med Virol* 2003; 70: 319-323.
19. Frisbie B, Tang YW, Griffin M, Poehling K, Wright PF, Holland K, et al. Surveillance of childhood influenza virus infection: what is the best diagnostic method to use for archival samples? *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1181-1184.
20. Hibbitts S, Rahman A, John R, Westmoreland D, Fox JD. Development and evaluation of NucliSens basic kit NASBA for diagnosis of parainfluenza virus infection with 'end-point' and 'real-time' detection. *J Virol Methods* 2003; 108: 145-155.
21. Poon LL, Wong BW, Chan KH, Ng SS, Yuen KY, Guan Y, et al. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3457-3459.
22. Keightley MC, Sillekens P, Schippers W, Rinaldo C, George KS. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J Med Virol* 2005; 77: 602-608.
23. Zhang ZW, Zhou YM, Zhang Y, Guo Y, Tao SC, Li Z, et al. Sensitive detection of SARS coronavirus RNA by a novel asymmetric multiplex nested RT-PCR amplification coupled with oligonucleotide microarray hybridization. *Methods Mol Med* 2005; 114: 59-78.
24. Lin B, Wang Z, Vora GJ, Thornton JA, Schnur JM, Thach DC, et al. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res* 2006; 16: 527-535.
25. Horejsh D, Martini F, Poccia F, Ippolito G, Di Caro A, Capobianchi MR. A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e13.
26. Amano Y, Cheng Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381: 156-164.

Βιοψία και ξέσματα ρινικού βλεννογόνου

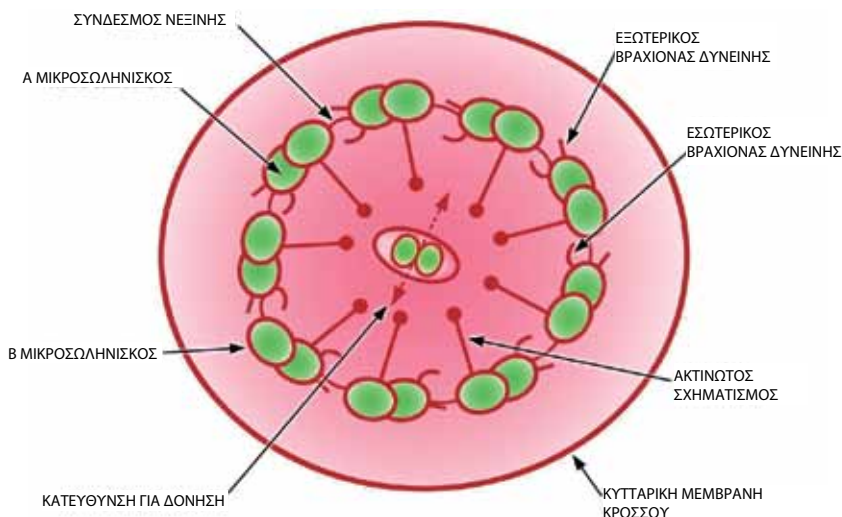
Μ. Μπαρτσώτα, Π. Γιάλλουρος

Είναι γενικά παραδεκτό ότι οι κροσσοί αποτελούν βασικό στοιχείο της άμυνας του αναπνευστικού συστήματος.^{1,2} Καλύπτουν την αναπνευστική οδό από το ρινικό βλεννογόνο έως τα τελικά βρογχιόλια και εκτελώντας συγχρονισμένες δονήσεις κατά κύματα με κατεύθυνση ίδια με αυτήν του εκπνεόμενου αέρα, συμβάλλουν μαζί με το βήχα στην απομάκρυνση των βρογχικών εκκρίσεων και των εισπνεόμενων σωματιδίων. Ο ρόλος της βλεννοκροσσώτης κάθαρσης στην απομάκρυνση μορίων που εναποτίθενται στους αεραγωγούς καθώς και στην προστασία έναντι «ζώντων» παραγόντων όπως βακτηρίων και ιών έχει ήδη τεκμηριωθεί τόσο σε υγιείς ενήλικους όσο, και σε υγιή παιδιά.^{3,4} Η δυσλειτουργία των κροσσών μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής (διαδρομή ιογενών και βακτηριακών λοιμώξεων, λήψη ασπιρίνης, έκθεση σε καπνό και ερεθιστικές ουσίες).^{5,6}

Το κύριο μέρος των κροσσών ονομάζεται *αξονέμιο* και αποτελείται από 9 περιφερικά ζεύγη μικροσωληνίσκων, τους *μικροσωληνίσκους Α* και *Β*, και ένα κεντρικό ζεύγος από μικροσωληνίσκους (Εικόνα 1). Ακτινωτοί σχηματισμοί συνδέουν τους περιφερικούς με τους κεντρικούς μικροσωληνίσκους, ενώ οι περιφερικοί σωληνίσκοι συνδέονται μεταξύ τους με συνδέσμους *νεξίνης*. Στους περιφερικούς μικροσωληνίσκους Α υπάρχουν συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι *δυνεΐνες*, οι οποίες σχηματίζουν τους εσωτερικούς και εξωτερικούς βραχίονες *δυνεΐνης*. Το αξονέμιο στη βάση του συνδέεται με το βασικό σώμα που αποτελείται από 9 τριπλούς μικροσωληνίσκους, δύο από τους οποίους είναι συνέχεια των δύο μικροσωληνίσκων του αξονεμίου. Στην παρουσία ATP οι βραχίονες *δυνεΐνης* του μικροσωληνίσκου Α προσκολλώνται στο μικροσωληνίσκο Β του παρακείμενου ζεύγους μικροσωληνίσκων και δημιουργούν μηχανισμό ολίσθησης ανάμεσα στα ζεύγη.⁷

Η *Πρωτοπαθής Δυσκινησία των Κροσσών* (ΠΔΚ) είναι γενετική διαταραχή που οφείλεται σε δυσλειτουργία των κροσσών. Κύριες κλινικές εκδηλώσεις αποτελούν οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, μαζί με μέση ωτίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα και βρογχεκτασίες. Οι μισοί από όλους τους ασθενείς με ΠΔΚ παρουσιάζουν και αναστροφή σπλάγχχνων. Άλλα κλινικά ευρήματα της νόσου αποτελούν η αναπνευστική δυσχέρεια στα νεογνά, η ανεπαρκής πρόσληψη βάρους στην παιδική ηλικία και η στειρότητα στους ενήλικους. Η διάγνωση της ΠΔΚ επιβεβαιώνεται με την εξέταση της βιοψίας και των ξεσμάτων του ρινικού βλεννογόνου, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει διαταραχές στη συχνότητα ή και τον τρόπο δόνησης των κροσσών που στις περισσότερες περιπτώσεις συνοδεύονται και από συγκεκριμένες ανωμαλίες της λεπτής δομής τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.⁸

Η ασφαλής επιβεβαίωση της διάγνωσης της ΠΔΚ μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να είναι



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση εγκάρσιας τομής κροσσού του αναπνευστικού επιθηλίου.

δύσκολη καθώς η δυσλειτουργία των κροσσών μπορεί να οφείλεται σε δευτεροπαθή αίτια, όπως πρόσφατες ιογενείς και μικροβιακές λοιμώξεις, κάπνισμα και εισπνοή ερεθιστικών ουσιών. Για το λόγο αυτό, αν υπάρχει λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος ο έλεγχος της λειτουργίας και δομής των κροσσών γίνεται τουλάχιστον 4-6 εβδομάδες αργότερα, διάστημα το οποίο απαιτείται για την αποκατάσταση των βλαβών του κροσσώτου επιθηλίου.⁹

Άλλη μέθοδος προσέλασης της διαγνωστικής δυσκολίας που προκαλούν οι δευτεροπαθείς αλλοιώσεις είναι η καλλιέργεια των κυττάρων του κροσσώτου επιθηλίου. Η παραγωγή με αυτόν τον τρόπο νέων κυττάρων κροσσώτου επιθηλίου που είναι απαλλαγμένα από τις βλαπτικές επιδράσεις εξωγενών παραγόντων μπορεί να βελτιώσει τη διαγνωστική ακρίβεια.¹⁰

ΛΗΨΗ ΡΙΝΙΚΟΥ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΥ

Η λήψη του ρινικού βλεννογόνου γίνεται με κυτταρολογική βούρτσα μιας χρήσης διαμέτρου 2-3 mm (ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς) από την κάτω ρινική χοάνη με απότομη ανακίνηση. Στα νεογνά και βρέφη μπορεί να χορηγηθεί 30 min νωρίτερα μικρή δόση μιδαζολάμης για μείωση του δυσάρεστου αισθήματος κατά τη δειγματοληψία.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΟΠΟΥ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΔΟΝΗΣΗΣ ΚΡΟΣΣΩΝ

Τα επιχρίσματα του ρινικού βλεννογόνου μετά τη λήψη τους τοποθετούνται σε ειδικό μέσο E199 με έντονη ανακίνηση της κυτταρολογικής βούρτσας. Το E199 μπορεί να διατηρήσει τα νησίδια του ρινικού βλεννογόνου με τους κροσσούς εν ζωή για 5-6 ώρες, διάστημα το οποίο παρέχει τη δυνατότητα εξέτασής τους σε πλήρη λειτουργικότητα με μικροσκόπιο φωτός ειδικά εξοπλισμένο με φωτομετρική δίοδο.¹⁵ Το προσαρμοσμένο ειδικό φωτόμετρο μετατρέπει την ένταση του φωτός σε ηλεκτρικό ρεύμα. Κατά τη μέτρηση το διάφραγμα του φωτόμετρου προσανατολίζεται έτσι ώστε ο υπό εξέταση κροσσός να δονείται εγκάρσια με

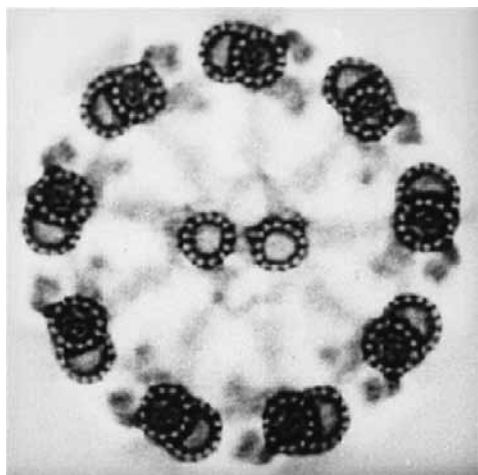
αυτό και να διακόπτει διαλειπόντως το φως από το να φθάσει στο φωτόμετρο. Το ηλεκτρικό σήμα που παράγεται υφίσταται επεξεργασία και δίνει μετρήσεις της συχνότητας δόνησης των κροσσών σε Hz. Παραλλαγή της φωτομετρικής μεθόδου αποτελεί η φωτοδίοδος (photodiode). Το εύρος των φυσιολογικών τιμών διαφέρει στις δύο μεθόδους. Γενικά στη βιβλιογραφία, ένα δείγμα θεωρείται φυσιολογικό εάν η συχνότητα δόνησης των κροσσών υπερβαίνει τα 11 Hz (11 δονήσεις/sec).

Την τελευταία δεκαετία έχει αναπτυχθεί η μέθοδος της ψηφιακής καταγραφής με κάμερα υψηλών ταχυτήτων (Digital High Speed Video Imaging), που επιτρέπει την εκτίμηση όχι μόνο της συχνότητας δόνησης των κροσσών, αλλά και του τρόπου δόνησής τους (beating pattern).¹⁶ Οι μετρήσεις της συχνότητας δόνησης των κροσσών γίνονται με ψηφιακή κάμερα υψηλών ταχυτήτων (FASTCAM Super 10K model 500 system-PHOTRON) η οποία καταγράφει εικόνες με ταχύτητα 500 frames/sec. Οι εικόνες ανασκοπούνται στη συνέχεια με ταχύτητα 50 frames/sec και εκτιμάται ο τρόπος δόνησης και η συχνότητα δόνησης των κροσσών. Κάθε εξεταζόμενο νησίδιο κροσσώτου επιθηλίου προβάλλεται σε οθόνη υψηλής ανάλυσης και χωρίζεται νοερά σε τμήματα μήκους 10 μm . Σε κάθε τμήμα πραγματοποιούνται 2 μετρήσεις της συχνότητας δόνησης. Συνολικά σε κάθε ασθενή πραγματοποιούνται μετρήσεις σε 50 τμήματα κροσσώτου επιθηλίου. Η συχνότητα δόνησης των κροσσών μπορεί να καθοριστεί άμεσα από το χρόνο που απαιτείται για να συμπληρώσουν οι ομάδες των δονούμενων κροσσών του εξεταζόμενου δείγματος 10 ολοκληρωμένους κύκλους δόνησης. Ο υπολογισμός της συχνότητας δόνησης των κροσσών υπολογίζεται από τον τύπο: $\text{CBF} = (500 / \text{αριθμός frames που απαιτούνται για την συμπλήρωση 10 ανεξάρτητων κύκλων δόνησης των κροσσών}) \times 10$. Φυσιολογική συχνότητα δόνησης είναι 11 Hz (9,7-18,7 Hz)

Η μελέτη του τρόπου δόνησης των κροσσών είναι απαραίτητη για τη διάγνωση της ΠΔΚ αφού είναι δυνατό ασθενείς με ΠΔΚ να έχουν φυσιολογική συχνότητα δόνησης, αλλά παθολογικό μοντέλο δόνησης.¹⁷ Έχει αναφερθεί σε επιχρίσματα κυττάρων ασθενών με μετατόπιση μικροσωληνίσκων σχεδόν φυσιολογική συχνότητα δόνησης, αλλά παθολογικός τρόπος κινητικότητας.¹⁸ Ακόμη, σε επιχρίσματα κυττάρων ασθενών όπου απουσίαζαν οι βραχίονες δυνεΐνης και είχαν σχεδόν φυσιολογική συχνότητα δόνησης, η νέα τεχνική της ψηφιακής καταγραφής επιβεβαίωσε την παρουσία παθολογικής κινητικότητας. Συμπερασματικά η μέθοδος της ψηφιακής καταγραφής με κάμερα υψηλών ταχυτήτων υπερτερεί της φωτομετρικής μεθόδου, γιατί εκτιμάται εκτός από τη συχνότητα δόνησης των κροσσών και ο τρόπος κινητικότητάς τους.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΡΟΣΣΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Τα τμήματα της βιοψίας ρινικού επιθηλίου αφού αξιολογηθούν για την κινητικότητα τοποθετούνται στη συνέχεια σε φιαλίδιο με το μονιμοποιητικό υγρό, γλουταραλδεύδη. Μετά διεξάγεται αντίδραση με 1% οσμικό οξύ, αφυδάτωση και έγκλιση σε μείγμα ρετίνης. Στη συνέχεια κόβονται ημιλεπτες τομές οι οποίες εξετάζονται με το φωτεινό μικροσκόπιο για τον εντοπισμό κροσσώτου επιθηλίου. Σε κάθε ασθενή ετοιμάζονται τομές πάχους 80-100 nm από δύο διαφορετικές περιοχές και εξετάζονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εγκάρσιες τομές, σε 50 τουλάχιστον ατομικούς κροσσούς. Κατά την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λαμβάνονται τουλάχιστον 15 αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες σε κάθε ασθενή. Οι φωτογραφίες συγκρίνονται με τη φυσιολογική δομή των κροσσών, δηλαδή με τη διάταξη 9+2 των μικροσωληνίσκων (Εικόνα 2), την παρουσία των βραχιόνων δυνεΐνης και των ακτινωτών σχηματισμών. Φυσιολογικά θα πρέπει να απεικονίζονται 6 εξωτερικοί



Εικόνα 2. Φυσιολογική διάταξη 9+2.

ως ένα από τα αίτια της ΠΔΚ, και οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν το στηρικτικό μηχανισμό ή/και το βασικό σώμα των κροσσών.¹¹ Η εκτίμηση του προσανατολισμού των κροσσών γίνεται με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Σε εγκάρσια διατομή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι γραμμές που φέρονται διαμέσου των κεντρικών σωληνίσκων των κροσσών από το ίδιο κύτταρο πρέπει να είναι όλες παράλληλες μεταξύ τους και να σχηματίζουν την ίδια γωνία με γραμμή που φέρεται κάθετα. Απόκλιση 10-15° θεωρείται φυσιολογική, ενώ ασθενείς με ΠΔΚ και τυχαίο προσανατολισμό των κροσσών έχουν απόκλιση >20-25°.^{12,13} Σε αυτές τις περιπτώσεις επειδή, όπως προαναφέρθηκε, η λοίμωξη μπορεί να επηρεάσει τον προσανατολισμό των κροσσών, συνιστάται επανάληψη της εξέτασης μετά θεραπευτική αγωγή και πάροδο 4-6 εβδομάδων.

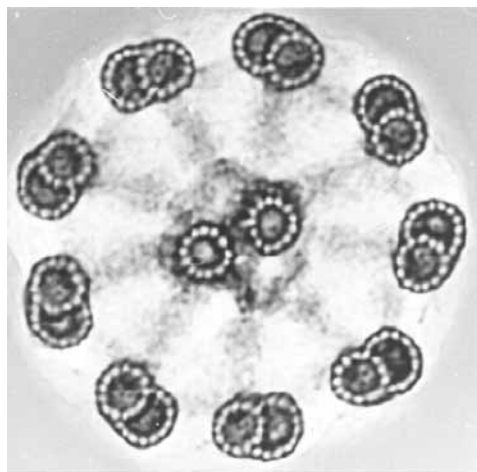
Η διαταραχή της κινητικότητας των κροσσών δεν συνοδεύεται υποχρεωτικά από διαταραχή της δομής τους. Έτσι, ασθενείς με τυχαίο προσανατολισμό των κροσσών μπορεί να έχουν τυπικά φυσιολογική δομή και φυσιολογική ή σχεδόν φυσιολογική συχνότητα δόνησης. Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα σε συγκεκριμένες δομικές ανωμαλίες και στο μοντέλο κινητικότητας. Για παράδειγμα, η μετατόπιση των μικροσωληνίσκων συνδυάζεται με μεγάλες αναποτελεσματικές κυκλικές κινήσεις των κροσσών, ανωμαλίες στον ακτινωτό σχηματισμό συνδυάζονται με δύσκαμπτους κροσσούς, ενώ ανωμαλίες στους εξωτερικούς ή και στους εσωτερικούς βραχίονες δυνεΐνης σχετίζονται με ακίνητους κροσσούς σε ποσοστό 55% και 80% αντίστοιχα.¹⁴

Ο έλεγχος των κροσσών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσιάζει περιορισμούς που

και 3 εσωτερικοί βραχίονες δυνεΐνης. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις, όσο και το ποσοστό των αλλοιώσεων, αναφέρονται στην τελική έκθεση που περιγράφει τα ευρήματα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για τον κάθε ασθενή. Δομικές αλλοιώσεις σε περισσότερους από 10% των εξεταζομένων κροσσών θεωρούνται παθολογικές.

Ο έλεγχος μπορεί να αποκαλύψει ποικίλες ανωμαλίες στην κατασκευή των κροσσών όπως πλήρη απουσία τους, απουσία βραχιόνων δυνεΐνης (Εικόνα 3) ή σωληνίσκων, ανωμαλίες της διάταξης των σωληνίσκων, διαταραχές των ακτινωτών σχηματισμών ή των συνδέσμων νεξίνης (Πίνακας 1).

Η διαταραχή στον προσανατολισμό των κροσσών πρόσφατα αναγνωρίστηκε



Εικόνα 3. Πλήρης απουσία εσωτερικών και εξωτερικών βραχιόνων δυνεΐνης.

Πίνακας 1. Ανωμαλίες μικροδομής κροσσών σε ασθενείς με ΠΔΚ.

ΑΝΩΜΑΛΙΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1. Βραχίονες δυνεΐνης ¹⁹	Απουσία ή ελαττωμένος αριθμός εξωτερικών ή/και εσωτερικών βραχιόνων
2. Σωληνίσκοι ²⁰	Απουσία ή μετατόπιση ή επιπλέον σωληνίσκοι
3. Ανωμαλίες στον ακτινωτό σχηματισμό ή συνδέσμους νεξίνης ^{21,22}	Απουσία
4. Διαταραχή προσανατολισμού των κροσσών ²³	Σταθερή απόκλιση (SD) > 20°, που δεν διορθώνεται με θεραπευτική αγωγή λοιμώξεων ή/και ανευρίσκεται σε κύτταρα από τη μύτη και από τους βρόγχους.
5. Διαταραχή στο βασικό σώμα ²⁴	
6. Απλασία κροσσών ²⁵	
7. Παθολογικά επιμηκυσμένοι κροσσοί ²⁶	
8. Απουσία ανωμαλιών στη δομή ²⁷	Επανάληψη ελέγχου και μελέτη του προσανατολισμού και του τρόπου της κινητικότητας των κροσσών (pattern)

είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αμφίβολα αποτελέσματα. Κοινά προβλήματα αποτελούν η κακή ποιότητα του δείγματος, λάθη στην προετοιμασία και επεξεργασία του δείγματος και περιορισμοί που αφορούν στην απεικόνιση των ημίλεπτων τομών. Καθώς οι ασθενείς με ΠΔΚ παρουσιάζουν συμπτώματα από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, όπως χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, είναι δύσκολη η λήψη δείγματος επιθηλίου με επαρκή αριθμό κροσσικών κυττάρων. Επιπλέον, εξαιτίας της χρόνιας λοίμωξης και φλεγμονής, στο δείγμα που λαμβάνεται συχνά υπάρχουν δευτεροπαθείς βλάβες των κροσσών καθώς και υπολείμματα νεκρωμένων κυττάρων που περιπλέκουν την ερμηνεία των ευρημάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι μικρές διαστάσεις των ημίλεπτων τομών περιορίζουν σημαντικά τη μελέτη των συστατικών δομών του αξονεμίου σε τρεις διαστάσεις και την διάταξή τους κατά μήκος των αξονεμίων. Επίσης οι συμβατικές χρώσεις βαρέων μετάλλων που χρησιμοποιούνται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να μην αποδίδουν την απαιτούμενη αντίθεση για την απεικόνιση των αξονεμίων. Επομένως για να εξασφαλιστούν αξιόπιστα αποτελέσματα, πρέπει να εξετάζεται ικανοποιητικός αριθμός ευκρινών εγκάρσιων τομών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defence mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002; 109: 571-577.
2. Wanner A, Salathi M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1868-1902.
3. Camner P, Jarstrand C, Philipson K. Tracheobronchial clearance in patients with influenza. *Am Rev Respir Dis* 1973; 108: 131-135.

4. Chilvers MA, O'Callaghan, C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 2000; 1: 27-34.
5. Mygind N, Pederson M, Nielsen MH. Primary and secondary ciliary dyskinesia. *Acta Otolaryngologica* 1983; 95: 688-694.
6. Chilvers MA, McKean M, Rutman A, Myint BS, Silverman M, O'Callaghan C. The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J* 2001; 18: 965-970.
7. Geremek M, Witt M. Primary ciliary dyskinesia: genes, candidate genes and chromosomal regions. *J Appl Genet* 2004; 45: 347-362.
8. Afzelius B. Immotile cilia syndrome: past, present and prospects for the future. *Thorax* 1998; 53: 894-897.
9. Bush A, Cole P, Hariri M, Mackay I, Phillips G, O'Callaghan C, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. *Eur Respir J* 1998; 12: 982-988.
10. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of ciliogenesis in culture. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 291-295.
11. Rutman A, Cullinan P, Woodhead M, Cole PJ, Wilson R. Ciliary disorientation: a possible variant of primary ciliary dyskinesia. *Thorax* 1993; 48: 770-771.
12. Rayner CF, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Cole PJ, Wilson R. Ciliary disorientation alone as a cause of PCD syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1123-1129.
13. Rayner CF, Rutman A, Dewar A, Cole PJ and Wilson R. Ciliary disorientation in patients with chronic upper respiratory tract inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 800-804.
14. Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 518-524.
15. Rutland J, Cole PJ. Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure. *Lancet* 1980; ii: 564-565.
16. Chilvers MA, O'Callaghan C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax* 2003; 58: 333-338.
17. Rossman CM, Newhouse MT. Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management. *Pediatr Pulmonol* 1988; 5: 36-50.
18. Rossman CM, Lee RM, Forrest JB, Newhouse MT. Nasal ciliary ultrastructure and function in patients with PCD compared with that in normal subjects and in subjects with various respiratory distress. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 161-167.
19. Cornillie FJ, Lauweryns JM. Atypical bronchial cilia in children with recurrent respiratory tract infections. *Pathol Res Pract* 1984; 178: 595-604.
20. Sturges JM, Chao J, Wong J, Aspin N, Turner JA. Transposition of ciliary microtubules. Another cause of impaired ciliary motility. *N Engl J Med* 1980; 303: 53-57.
21. Sturges JM, Chao J, Wong J. Cilia with defective radial spokes: A cause of human respiratory disease. *N Eng J Med* 1980; 300: 318-322.
22. Carlen B, Lindberg S, Stenram U. Absence of nexin links as a possible cause of primary ciliary dyskinesia. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27: 123-126.
23. Rutland J, de longh RU. Random ciliary orientation. A cause of respiratory tract disease. *N Engl J Med*. 1990; 323: 1681-1684.
24. Lungarella G, De Santi MM, Palatresi R. Ultrastructural observations on basal apparatus of respiratory cilia in immotile cilia syndrome. *Eur J Respir Dis* 1985; 66: 165-172.
25. Fonzi L, Lungarella G, Palatresi R. Lack of kinocilia in the nasal mucosa in the immotile-cilia syndrome. *Eur J Respir Dis* 1982; 63: 558-563.
26. Afzelius BA, Gargani G, Romano C. Abnormal length of cilia as a possible cause of defective mucociliary clearance. *Eur J Respir Dis* 1985; 66: 173-180.
27. Greenstone MA, Dewar A, Cole PJ. Ciliary dyskinesia. with normal ultrastructure. *Thorax* 1983; 38: 875-876.

Βιοψία βρογχικού βλεννογόνου

N. Καβαντζάς

Η λήψη βρογχικών βιοψιών σε παιδιά έχει ιδιαίτερα αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της χρήσης των παιδιατρικών βρογχοσκοπίων νέας γενιάς (οπτικής ίνας). Είναι δυνατό να ληφθούν βιοψίες από το τοίχωμα των βρόγχων ή από ενδοβρογχικές μάζες (ενδοβρογχικές βιοψίες – EBB) ή από το περιφερικό πνευμονικό παρέγχυμα (διαβρογχικές βιοψίες – TBB). Η χρήση των βρογχοσκοπίων οπτικής ίνας επιτρέπει τη λήψη βιοψιών ακόμη και σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 2 ετών.

ΤΕΧΝΙΚΗ – ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Κύριες ενδείξεις για τη λήψη ενδοβρογχικής βιοψίας σε παιδιά είναι η διερεύνηση για άσθμα, κυστική ίνωση και πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών. Βιοψίες κατάλληλες για ιστολογική εξέταση πρέπει να έχουν μήκος βασικής μεμβράνης τουλάχιστον 1 mm και εμβαδόν υποεπιθηλιακής περιοχής τουλάχιστον 0,1 mm². Προκειμένου να μελετηθεί η βιοψία σε ιστολογικές τομές ρουτίνας χρωσμένες με ηωσίνη-αιματοξυλίνη ή με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική χρώση απαραίτητη είναι η μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% και μετά από αυτοματοποιημένη διαδικασία αφυδάτωσής του εμβαπτίζεται σε παραφίνη προκειμένου να ληφθούν από κύβο παραφίνης τομές προς ιστολογική εξέταση ή ανοσοϊστοχημική χρώση.

Για τη διερεύνηση παιδιού με πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών οι βρογχικές βιοψίες μονιμοποιούνται σε 5 ml γλουταραλδεΰδης 4% και ακολούθως εξετάζονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (H/M).

Κύριες ενδείξεις για λήψη διαβρογχικής βιοψίας είναι η διερεύνηση για ευκαιριακές λοιμώξεις, για διάμεσα πνευμονικά νοσήματα και για τη διάγνωση της οξείας απόρριψης σε πνευμονικά μοσχεύματα. Όμως, ειδικά για παιδιά ηλικίας <2 ετών μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολη η λήψη βιοψίας η οποία να περιέχει ικανοποιητική ποσότητα πνευμονικού παρεγχύματος. Η σοβαρότερη επιπλοκή κατά τη λήψη της διαβρογχικής βιοψίας είναι ο πνευμοθώρακας, με επίπτωση περίπου 3%. Άλλη επιπλοκή κατά τη λήψη της ενδοβρογχικής αλλά και της διαβρογχικής βιοψίας είναι η αιμορραγία.

ΒΡΟΓΧΙΚΗ ΒΙΟΨΙΑ ΣΤΟ ΠΑΙΔΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Η σημαντικότερη ένδειξη για τη λήψη βρογχικής βιοψίας σε παιδιά είναι η διερεύνηση του άσθματος. Ως γνωστόν, το άσθμα είναι χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, απόφραξη και ανακατασκευή (remodeling) των αεραγωγών. Στις δομικές μεταβολές κατά

τη διάρκεια της ανακατασκευής των αεραγωγών περιλαμβάνονται η πάχυνση της βασικής μεμβράνης, η αυξημένη εναπόθεση πρωτεΐνης στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, η αύξηση λείων μυϊκών ινών, η αγγειογένεση και η υπερπλασία των βλεννοποιών αδένων.

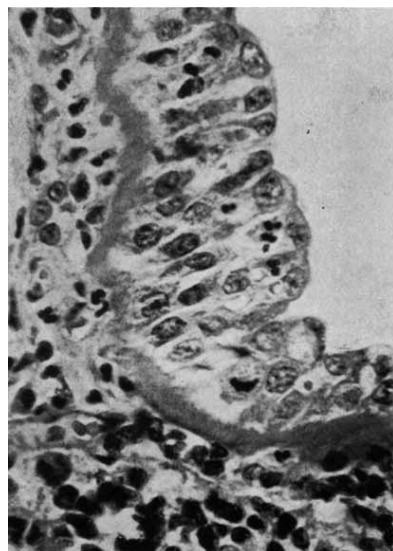
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Οι δομικές μεταβολές του βρογχικού τοιχώματος που θεωρούνται τυπικές για το άσθμα και είναι ιστολογικά ορατές είναι η απώλεια του επιθηλίου, η πάχυνση της βασικής μεμβράνης και η αυξημένη αγγειοβρίθεια της υποεπιθηλιακής στιβάδας. Αυτές οι δομικές μεταβολές οδηγούν σε αύξηση του πάχους του βρογχικού τοιχώματος που με τη σειρά του επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία και τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθματικών ασθενών.¹

Σε τομές χρωσμένες με ηωσίνη-αιματοξυλίνη η πάχυνση της βασικής μεμβράνης έχει στο απλό μικροσκόπιο την εμφάνιση υαλίνης και δομικά αποτελείται από πλεξοειδή διάταξη των δικτυωτών ινών, οι οποίες εμφανίζονται ως ινίδια εντός αμόρφου υλικού. Η παχυσμένη δικτυωτή στιβάδα συνδυάζεται με εναπόθεση ανοσοσφαιρινών ή κολλαγόνου I και III, τενασίνης και ινονεκτίνης. Η πάχυνση της βασικής μεμβράνης είναι γνωστός πρόδρομος δείκτης της ανακατασκευής των αεραγωγών.^{1,2} Πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι η πάχυνση της βασικής μεμβράνης είναι ήδη παρούσα στα ασθματικά παιδιά και μάλιστα σε έκταση παρόμοια με των ασθματικών ενηλίκων. Άλλοι ερευνητές αξιολογούν μεταξύ των δομικών μεταβολών που ευθύνονται πιθανώς για την απόφραξη των αεραγωγών σε ασθματικά παιδιά την αύξηση τόσο του αριθμού (υπερπλασία) όσο και του μεγέθους (υπερτροφία) των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών και την πυκνότητα του αγγειακού δικτύου.³ Η συνολική επιφάνεια των λείων μυϊκών ινών βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθματικά παιδιά με επίμονη αποφρακτική εικόνα.

Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που εξειδικεύονται στη μελέτη-διερεύνηση των δομικών μεταβολών των αεραγωγών είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (TGF- β), οι αγγειακοί παράγοντες CD31 και CD34, ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-R), η ακτίνη των λείων μυϊκών ινών (SMA) και τα κολλαγόνα I και III.

Η απώλεια του επιθηλίου των αεραγωγών είναι άλλη μία δομική μεταβολή των ασθματικών ασθενών.⁴ Η καταστροφή του επιθηλίου οφείλεται κυρίως στην απώλεια της στιβάδας των κυλινδρικών κυττάρων. Το κατεστραμμένο επιθήλιο πυροδοτεί μία σειρά γεγονότων που οδηγούν στην ανακατασκευή των αεραγωγών μέσω απελευθέρωσης μιτωτικών και ινοποιητικών αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών, την αγγειογένεση και την πάχυνση της βασικής μεμβράνης.⁵ (Εικόνα 1). Όσον αφορά στην αγγειογένεση παρατηρείται αύξηση του αριθμού των αγγείων και της αγγειακής επιφάνειας



Εικόνα 1. Βιοψία βρόγχου όπου στο βρογχικό επιθήλιο παρατηρείται μιτωτική δραστηριότητα και πάχυνση της βασικής μεμβράνης (H-E x 400).

στο τοίχωμα των αεραγωγών των ασθματικών παιδιών. Είναι βασικό να επισημανθεί ότι τα βρογχικά αγγεία θεωρούνται ως η πύλη εισόδου των φλεγμονωδών κυττάρων στο τοίχωμα των αεραγωγών και συνεπώς συνεισφέρουν στη χρόνια φλεγμονή.⁴

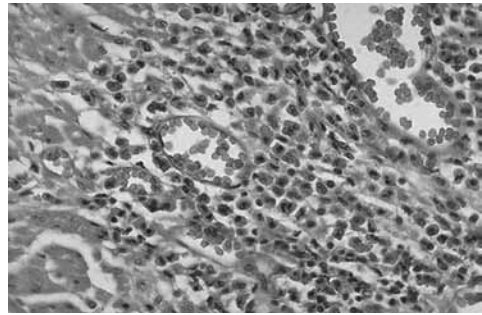
Λόγω της φύσης του άσθματος ως χρόνιας φλεγμονώδους νόσου, η ιστολογική ποιοτική και ποσοτική, ανίχνευση φλεγμονωδών κυττάρων είναι καθοριστική.^{6,7}

Πρωτίστως, η ηωσινοφιλία των αεραγωγών είναι το κύριο εύρημα σε παιδιά με ήπια/μέσης βαρύτητας άσθμα, εύρημα που παρατηρείται όμως και σε παιδιά με ατοπία αλλά χωρίς κλινική εικόνα άσθματος (Εικόνα 2).

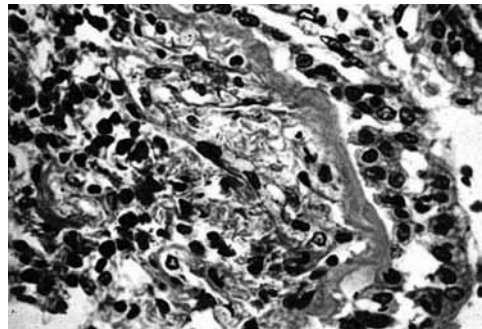
Εκτός από τα ηωσινόφιλα, στις βρογχικές βιοψίες ασθματικών παιδιών είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και αυξημένος αριθμός μακροφάγων, ενώ ο αριθμός των ουδετεροφίλων δεν φαίνεται να σχετίζεται με το άσθμα. Αντίθετα, ελαττωμένος εμφανίζεται συνήθως ο αριθμός των μαστοκυττάρων και των CD4 T-λεμφοκυττάρων σε σχέση τόσο με τα ατοπικά όσο και με τα φυσιολογικά παιδιά (Εικόνα 3).

Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος με διάφορους κυρίως μετατρεπτικούς αυξητικούς παράγοντες όπως ο TGFβ₁, ο TGFβ-R_I και ο TGFβ-R_{II} έδειξε ότι η έκφραση του TGFβ₁ ήταν παρόμοια τόσο στα παιδιά με άσθμα όσο και στα φυσιολογικά και με ατοπία παιδιά.

Αντίθετα, η έκφραση του TGFβ-R_{II} βρέθηκε στατιστικά σημαντικά ελαττωμένη στα παιδιά με άσθμα σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες παιδιών, ενώ η έκφραση του TGFβ-R_I δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων των παιδιών που εξετάστηκαν. Συνεπώς η χρήση του TGFβ-R_{II} ως ανοσοϊστοχημικού δείκτη μπορεί να θεωρηθεί σημαντική στη διαφορική διάγνωση παιδιών με άσθμα από τα παιδιά με ατοπία χωρίς άσθμα.⁶



Εικόνα 2. Βιοψία βρόγχου όπου παρατηρείται ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός ηωσινοφίλων στο υπόστρωμα (H-Ex400).



Εικόνα 3. Βιοψία βρόγχου με πάχυνση της βασικής μεμβράνης, παρουσία ηωσινοφίλων και χρόνιων φλεγμονωδών στοιχείων στο υπόστρωμα (H-Ex400).

ΑΛΛΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Μεταξύ των υπολοίπων ενδείξεων για τη λήψη βρογχικής βιοψίας σε παιδιά όπως είναι η διερεύνηση της κυστικής ίνωσης, διαφόρων διαμέσων πνευμονικών νοσημάτων και ευκαιριακών λοιμώξεων (με τη βοήθεια καλλιέργειας του ιστού), σημαντικότερη θεωρείται η διερεύνηση για πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών, κατάσταση η οποία απαιτεί υποχρεωτικά τη χρήση Η/Μ και εξειδικευμένου στο Η/Μ Παθολογοανατόμου, με αποτέλεσμα ελάχιστα Κέντρα τουλάχιστον στη χώρα μας να είναι σε θέση να την πραγματοποιήσουν.

Η συνεχής έρευνα της Ανοσολογίας και η μελλοντική συνεισφορά της στη δημιουργία

νέων ανοσοϊστοχημικών δεικτών περισσότερο εξειδικευμένων για συγκεκριμένες ομάδες κυττάρων υπόσχονται να καταστήσουν την Παθολογική Ανατομική πιο χρήσιμη στην ταυτοποίηση και στη διαφορική διάγνωση των διαφόρων νοσημάτων των βρόγχων και των πνευμόνων μέσω της ιστολογικής εξέτασης της ενδοβρογχικής και διαβρογχικής βιοψίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kim ES, Kim SH, Kim KW, Park JW, Kim YS, Sohn MH, et al. Basement membrane thickening and clinical features of children with asthma. *Allergy* 2007; 62: 635-640.
2. Baena-Cagnani C, Rossi G, Caronica GW. Airway remodeling in children: when does it start? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 196-200.
3. Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scoinmann P, Gosset P. Airway remodelling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy* 2008; 63: 533-541.
4. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 975-981.
5. Hackett T-L, Knight DA. The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 63-68.
6. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, et al. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 798-803.
7. Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg PL, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodelling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 722-727.

Διαδερμική (διαθωρακική) παρακέντηση πνεύμονα

Ε. Γαλανάκης

Η ακριβής αιτιολογία της πνευμονίας στα παιδιά παραμένει κατά κανόνα άγνωστη, ακόμη και στις συνηθισμένες βακτηριακές πνευμονίες της κοινότητας. Οι καλλιέργειες αίματος αποβαίνουν σπανίως θετικές (<10% των περιπτώσεων), οι καλλιέργειες ρινοφάρυγγα δεν αντικατοπτρίζουν πιστά την πνευμονική χλωρίδα, η λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος μπορεί να γίνει μόνο σε ειδικές Μονάδες, και οι ορολογικές μέθοδοι καθυστερούν και είναι μη ειδικές ή δυσερμήνευτες. Έτσι στην πνευμονία, την πολύ συχνή αυτή λοίμωξη των παιδιών, το πρόβλημα της λήψης αξιόπιστου δείγματος για καλλιέργεια παραμένει χωρίς ικανοποιητική λύση.

ΟΡΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΑ

Η διαδερμική (ή διαθωρακική) παρακέντηση πνεύμονα είναι μέθοδος γνωστή για περισσότερο από 100 χρόνια: η πρώτη αναφορά¹ χρονολογείται από το 1882 και η πρώτη παιδιατρική αναφορά από το 1909.² Στη βιβλιογραφία η μέθοδος συναντάται ως lung tap, lung aspiration, lung puncture, thoracic puncture, needle aspiration, transthoracic needle aspiration, και percutaneous needle aspiration.³ Η τεχνική ποτέ δεν έτυχε ευρείας εφαρμογής, μάλιστα μετά από την ανακάλυψη αποτελεσματικών εμπειρικών αντιβιοτικών και την επακόλουθη βελτίωση της πρόγνωσης της πνευμονίας, η τεχνική περιέπεσε σε αφάνεια και είναι πρακτικά άγνωστη στους γιατρούς της εποχής μας. Ωστόσο, πρόσφατα έχει αναθερμανθεί η συζήτηση για τη χρήση της, με το σκεπτικό της ακριβέστερης γνώσης της αιτιολογίας σε μια εποχή μάλιστα με εξάπλωση των ανθεκτικών παθογόνων.^{3,4}

ΣΚΟΠΟΣ

Η διαδερμική παρακέντηση πνεύμονα επιδιώκει τη λήψη δειγμάτων από το πνευμονικό παρέγχυμα για μικροβιολογική εξέταση. Όπως και η ανοικτή βιοψία πνεύμονα, εξασφαλίζει δείγματα χωρίς επιμόλυνση από τη μικροβιακή χλωρίδα του στόματος ή των ανώτερων αεραγωγών. Εκτός από την τυπική της χρήση στη διάγνωση της πνευμονίας, η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και για τη διάγνωση της πνευμονικής φυματίωσης.³

ΤΕΧΝΙΚΗ

Η εξέταση παλιότερα γινόταν με χοντρή βελόνα παρακέντησης, όμως τα τελευταία χρόνια προτιμάται η λεπτή βελόνα 20-22 g.⁵⁻⁷ Η τεχνική έχει αναλογίες με την οσφυονωτιαία παρακέντηση και την παρακέντηση για λήψη πλευριτικού υγρού. Το παιδί κρατείται καλά σε καθιστή ή ύπτια θέση. Προηγείται τοπική αναισθησία και καθαρισμός του δέρματος. Συνιστάται σύριγγα των 5 ml, συνήθως με 2,5 ml χλωρονατριούχου διαλύματος 0,9%.⁴ Η βελόνα εισάγεται εφαιπόμενη στο ανώτερο χείλος της ενδεικνυόμενης πλευράς, με ή χωρίς ακτινοσκοπική ή άλλη καθοδήγηση έως την περιοχή όπου η ακτινογραφία και η κλινική εξέταση έχουν υποδείξει πύκνωση, γίνεται έγχυση 1,5 ml του διαλύματος, και ακολουθεί επαναρρόφηση και απόσυρση της βελόνας.⁴ Η όλη τεχνική πρέπει να γίνει το ταχύτερο δυνατόν και σε πρόσφατη μελέτη η διάρκειά της υπολογίσθηκε <10 sec.⁴ Έχει προταθεί να ακολουθείται από ακτινογραφία θώρακα μετά από 2 ώρες και την επόμενη ημέρα της εξέτασης.⁴

ΑΝΑΛΥΣΗ

Το δείγμα, δηλαδή λίγες σταγόνες έως λίγα ml υγρού, εξετάζεται μικροσκοπικά και καλλιεργείται, όπως γίνεται με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Αξιόπιστο θεωρείται το δείγμα που περιέχει λευκοκύτταρα στην μικροσκοπική εξέταση.⁴ Εννοείται ότι για την καλλιέργεια ιών, μυκοπλασμάτων και χλαμυδίων θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ειδικά θρεπτικά υλικά.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Επί του παρόντος, η κύρια ένδειξη της διαδερμικής παρακέντησης πνεύμονα είναι η πνευμονία ακαθόριστης αιτιολογίας που δεν ανταποκρίνεται στην αγωγή, και μάλιστα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με ευπάθεια σε ασυνήθιστα παθογόνα.

ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ

Εκτεταμένη ανασκόπηση των μελετών που χρησιμοποίησαν διαδερμική παρακέντηση πνεύμονα κατέδειξε εξακρίβωση της βακτηριακής αιτιολογίας στο 50% περίπου και σαφή υπεροχή της μεθόδου σε σχέση με την καλλιέργεια αίματος.³ Καθώς η εξέταση των δειγμάτων δεν είχε γίνει πάντα με τον καλύτερο τρόπο, είναι εύλογο ότι η χρήση προηγμένων μεθόδων ανίχνευσης, όπως η αναζήτηση αντιγόνων και η PCR, αυξάνει σημαντικά το ποσοστό διάγνωσης.^{8,9} Επί πλέον, οι έως τώρα μελέτες δεν έχουν χρησιμοποιήσει εκτενώς ιολογικές μεθόδους και συνεπώς παραμένει άγνωστη η ευαισθησία της μεθόδου όσον αφορά στα ιογενή αίτια της πνευμονίας.³ Σε πρόσφατη μελέτη η εξακρίβωση της αιτιολογίας σε 34 παιδιά με πνευμονία της κοινότητας έφτασε το 59%.⁴ Προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών μπορεί να μειώσει την ευαισθησία της μεθόδου.

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Ψευδώς θετικά ευρήματα είναι ασυνήθιστα,⁷ αλλά ψευδώς αρνητικά μπορεί να προκύψουν από την είσοδο της βελόνης σε λάθος σημείο, τη λήψη ανεπαρκούς δείγματος, ή την προηγηθείσα αγωγή.^{3,4} Σε πειραματόζωα, η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου βρέθηκαν καλύτερες από εκείνες της διαβρογχικής βιοψίας.¹⁰ Σε σύγκριση με τη διατρα-

χειρακή αναρρόφηση σε ενηλίκους, η διαδερμική παρακέντηση πνεύμονα ήταν πιο πιθανό να αποδώσει ψευδώς αρνητικά αλλά όχι ψευδώς θετικά ευρήματα.¹¹ Η ανοικτή βιοψία πνεύμονα παραμένει μεν ο χρυσός κανόνας για τη διάγνωση της αιτιολογίας της πνευμονίας, ωστόσο προϋποθέτει γενική αναισθησία, επέμβαση διάρκειας 30-45 min και σωλήνα παροχέτευσης για 1-2 ημέρες, σε αντίθεση με τη διαδερμική παρακέντηση που μπορεί να γίνει επί κλίνης, χωρίς αναισθησία και χωρίς σωλήνα παροχέτευσης, ενώ αποδίδει εξ ίσου αξιόπιστα θετικά αποτελέσματα.^{3,12}

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Παρά το παρεμβατικό της μεθόδου, η ανασκόπηση των σχετικών μελετών καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η διαδερμική παρακέντηση πνεύμονα είναι εν γένει ασφαλέστερη από όσο θεωρείται.^{3,4} Οι πιθανές επιπλοκές είναι οι ίδιες της θωρακοκέντησης για τη λήψη πλευριτικού υγρού, η συχνότητα του πνευμοθώρακα είναι όμως μεγαλύτερη -υπολογίζεται στο 3%- και έχουν αναφερθεί ποσοστά έως 18%.^{3,4} Η ανάπτυξη πνευμοθώρακα εξαρτάται και από την υποκείμενη πνευμονική παθολογία, και επί πνευμονίας από *Pneumocystis* η συχνότητα μπορεί να φτάσει το 30%. Ο πνευμοθώρακας είναι συνήθως ασυμπτωματικός και υποχωρεί αφ' εαυτού, αλλιώς συνιστάται η τοποθέτηση μικρού σωλήνα παροχέτευσης. Αιμόπτυση έχει αναφερθεί στο 1,3% των περιπτώσεων και υποδόριο εμφύσημα στο 0,2%.³ Ευρύτατη ανασκόπηση των δημοσιευμένων μελετών παγκοσμίως έχει υποδείξει 3 θανάτους που σχετίστηκαν με την παρακέντηση, ωστόσο θεωρήθηκε πιθανή η συμβολή και άλλων παραγόντων, όπως η ανεπαρκής παρακολούθηση και αντιμετώπιση των ασθενών.³

ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Σε μελέτες διαδερμικής παρακέντησης πνεύμονα έχουν αποκλεισθεί ασθενείς με αιμορραγική διάθεση και περιοχές πύκνωσης που αντιστοιχούν στη μεσομαζική χώρα στο πρόσθιο θωρακικό και στην ωμοπλατιαία στο οπίσθιο θωρακικό τοίχωμα.⁴

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η διαδερμική παρακέντηση πνεύμονα είναι μεν εξαιρετικά ασυνήθιστη επί του παρόντος, ωστόσο η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δείχνει ότι πρόκειται για παλιά και απλή μέθοδο με πλεονεκτήματα, σχετικά ασφαλή όταν γίνεται σωστά και αξίζει να επανεξεταστεί η χρήση της σε κέντρα που μπορούν να αντιμετωπίσουν τις πιθανές επιπλοκές της. Δεν αποτελεί βέβαια εξέταση καθημερινής χρήσης σε παιδιά με πνευμονία, ωστόσο σε επιλεγμένες περιπτώσεις μπορεί να αποδώσει πολύτιμες πληροφορίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Leyden I. VII Verhandlungen des Vereins für innere Medizin: über infektiöse Pneumonie. Deutsch Med Wschr 1882; 4: 42-44.
2. Horder TJ. Lung puncture: a new application of clinical pathology. Lancet 1909; ii: 1345-1346.
3. Vuori-Holopainen E, Peltola H. Reappraisal of lung tap: review of an old method for better etiologic diagnosis of childhood pneumonia. Clin Infect Dis 2001; 32: 715-726.

4. Vuori-Holopainen E, Salo E, Saxen H, Hedman K, Hyypia T, Lahdenpera R, et al. Etiological diagnosis of childhood pneumonia by use of transthoracic needle aspiration and modern microbiological methods. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 583-590.
5. Mimica I, Donoso E, Howard JE, Ledermann GW. Lung puncture in the etiological diagnosis of pneumonia. A study of 543 infants and children. *Am J Dis Child* 1971; 122: 278-282.
6. Shann F, Gratten M, Germer S, Linnemann V, Hazlett D, Payne R. Aetiology of pneumonia in children in Goroka Hospital, Papua New Guinea. *Lancet* 1984; ii (8402): 537-541.
7. Busk MF, Rosenow EC 3rd, Wilson WR. Invasive procedures in the diagnosis of pneumonia. *Semin Respir Infect* 1988; 3: 113-122.
8. Bella F, Tort J, Morera MA, Espauella J, Armengol J. Value of bacterial antigen detection in the diagnostic yield of transthoracic needle aspiration in severe community acquired pneumonia. *Thorax* 1993; 48: 1227-1229.
9. Garcva A, Roson B, Pirez JL, Verdaguer R, Dorca J, Carratalü J, et al. Usefulness of PCR and antigen latex agglutination test with samples obtained by transthoracic needle aspiration for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 709-714.
10. Moser KM, Maurer J, Jassy L, Kremsdorf R, Konopka R, Shure D, et al. Sensitivity, specificity, and risk of diagnostic procedures in a canine model of *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 436-442.
11. Bartlett JG. Diagnosis of bacterial infections of the lung. *Clin Chest Med* 1987; 8: 119-134.
12. Ginland M. Diagnostic lung puncture. *Pediatrics* 1969; 44: 471-473.

Βιοψία πνεύμονα

Θ. Τσιλιγιάννης, Κ. Στεφανάκη

Η βιοψία πνεύμονα είναι επεμβατική διαδικασία που προϋποθέτει γενική αναισθησία και είναι απαραίτητη όταν δεν είναι εφικτή η διάγνωση της υποκείμενης πάθησης με τις υπόλοιπες διαγνωστικές μεθόδους. Εμπεριέχει πάντοτε το ενδεχόμενο επιπλοκών, γι' αυτό δεν είναι εύκολο για τον παιδίατρο ή και τον παιδοπνευμονολόγο να την προτείνει και συνήθως διενεργείται αφού έχουν εξαντληθεί όλα τα υπόλοιπα διαγνωστικά μέσα.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Στους ενήλικους ασθενείς συνηθέστερη ένδειξη βιοψίας πνεύμονα αποτελεί η υποψία κακοήθους όγκου και η ταυτοποίηση μονήρους όζου. Οι καταστάσεις αυτές στα παιδιά είναι σπανιότατες αλλά η διενέργεια βιοψίας είναι σχεδόν πάντοτε επιβεβλημένη όταν αυτές υφίστανται. Η ανάγκη για βιοψία πνεύμονα στην παιδοπνευμονολογία προκύπτει κυρίως σε μια μεγάλη ποικιλία από διάχυτες παρεγχυματικές πνευμονοπάθειες, συγγενείς ή επίκτητες, των οποίων η αιτιολογία και η παθογένεια δεν είναι σαφής και δεν είναι δυνατό να διευκρινιστεί με άλλα διαγνωστικά μέσα (Πίνακας 1).^{1,2} Ο κύριος σκοπός της διενέργειας βιοψίας πνεύμονα, είναι η τεκμηρίωση της διάγνωσης και η επιλογή ειδικής θεραπευτικής αγωγής. Σε ειδικές περιπτώσεις όπως σε συγγενείς καρδιοπάθειες με υποψία συνύπαρξης σπάνιων συγγενών ανωμαλιών των πνευμόνων που είναι ανιάτες, όπως η κυψελιδοτριχοειδική δυσπλασία, η βιοψία διενεργείται με σκοπό να αποφευχθεί η μάταιη καρδιοχειρουργική επέμβαση ή να παραταθεί η υποστήριξη της ζωής με εξαιρετικά επεμβατικές και δαπανηρές θεραπευτικές μεθόδους όπως η ECMO.³⁻⁵ Σε ορισμένες πάντως περιπτώσεις, όπως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με διάχυτη πνευμονοπάθεια, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την ισχυρή ένδειξη και τα οφέλη από την διενέργειά της.⁶ Έτσι σε ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού των οστών και διάχυτη πνευμονοπάθεια η ανοιχτή βιοψία πνεύμονα συνεισφέρει στην τεκμηρίωση της διάγνωσης και στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας,⁷⁻⁹ ενώ το διαγνωστικό αποτέλεσμα της διαβρογχικής βιοψίας δεν είναι σαφές.^{10,11}

ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Απόλυτες αντενδείξεις δεν υπάρχουν, εφόσον η βιοψία πνεύμονα είναι ο μόνος τρόπος να τεκμηριωθεί η διάγνωση. Οι σχετικές αντενδείξεις είναι σπάνιες. Η μη ελεγχόμενη αιμορραγική διάθεση και οι βαριές διαταραχές της πήκτικότητας του αίματος αποτελούν σχετική αντένδειξη όπως σε κάθε χειρουργική επεμβατική διαδικασία. Επίσης, προκειμένου για θωρακοσκοπική βιοψία, ο ασθενής θα πρέπει να μπορεί να ανεχθεί τη γενική αναισθησία με την λειτουργική χρήση του ενός μόνον πνεύμονα.

Πίνακας 1. Ενδείξεις βιοψίας πνεύμονα σε παιδιά.

- Διάχυτες (διάμεσες) πνευμονοπάθειες
- Δυσπλασίες πνευμόνων
- Συγγενείς καρδιοπάθειες με συνοδές αγγειακές ανωμαλίες
- Ιδιοπαθής πνευμονική υπέρταση
- Διάχυτες πνευμονοπάθειες λοιμώδους αιτιολογίας με αδιευκρίνιστο αίτιο
- Υποψία ειδικών λοιμώξεων
- Λοιμώξεις πνευμόνων σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς
- Οζώδεις βλάβες πνευμόνων
- Όγκοι πνευμόνων
- Ενδοβρογχικοί όγκοι
- ARDS
- Μεταμόσχευση πνεύμονα
- Νεογνά ή βρέφη με ενδεχόμενη βαριάς μορφής δυσπλασία πνεύμονα προκειμένου να αποφασισθεί η συνέχιση ή μη της θεραπείας (ECMO, καρδιοχειρουργική επέμβαση)

ΠΕΡΙΟΧΗ ΒΙΟΨΙΑΣ

Σε εντοπισμένη βλάβη η περιοχή της βιοψίας είναι αυτονόητη. Αντίθετα, σε διάχυτη πνευμονοπάθεια θα πρέπει να επιλεγεί η περιοχή που αντιπροσωπεύει τις κύριες αλλοιώσεις. Σε περιπτώσεις αμφιβολίας ο ιστός που θα ληφθεί θα πρέπει να εμπεριέχει εκτός του παθολογικού, εφόσον είναι δυνατόν, και υγιή ιστό. Σε γενικές γραμμές σε διάχυτη πνευμονοπάθεια οποιαδήποτε περιοχή μπορεί να είναι κατάλληλη για βιοψία. Υπάρχει σχετική διχογνωμία για την λήψη βιοψίας από την κορυφή της γλωσσίδας και του δεξιού μέσου λοβού και μερικοί συγγραφείς συνιστούν να αποφεύγεται.^{12,13} Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχουν ενδείξεις, κυρίως στους ενήλικους και λιγότερο στα παιδιά, ότι αυτές οι περιοχές προσβάλλονται λιγότερο σε διάχυτες πνευμονοπάθειες και γι'αυτό δεν είναι αντιπροσωπευτικές του βαθμού και της έκτασης της γενικότερης βλάβης του πνευμονικού παρεγχύματος. Νεότερες μελέτες αμφισβητούν αυτή την άποψη.¹² Ιδιαίτερα σε ασθενείς σε ανοσοκαταστολή, η γλωσσίδα είναι πολύ εύκολα προσπελάσιμη με μικρή θωρακοτομή και με ελάχιστη νοσηρότητα.

Το τεμάχιο του ιστού που θα ληφθεί θα πρέπει να έχει διαστάσεις τουλάχιστον 1x1x1 cm, να διενεργείται με σφηνοειδή εκτομή και με την κορυφή τουλάχιστον κατά 1 cm εντός του πνευμονικού παρεγχύματος. Πρέπει να περιλαμβάνει οπωσδήποτε λοβιδιακό ιστό και βρογχιόλια.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Αν και η θέση και το είδος της βλάβης αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για τον τρόπο που θα ληφθεί η βιοψία, υπάρχουν διάφορες τεχνικές λήψης του ιστολογικού υλικού.

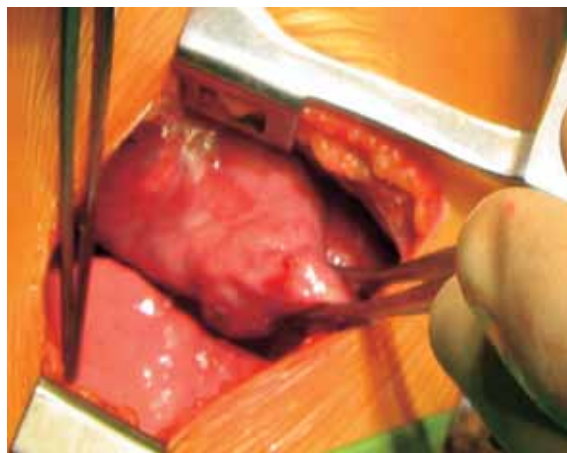
Η κλασσική μέθοδος της ανοιχτής θωρακοτομής, (Εικόνα 1) έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα, γιατί επιτρέπει τον καλύτερο οπτικό έλεγχο του πνευμονικού παρεγχύματος και παρέχει τη δυνατότητα για ευχερέστερο χειρισμό και καταλληλότερη επιλογή του σημείου που έχει την ανάλογη παθολογία για τη λήψη της βιοψίας. Σε ασθενείς που υποστηρίζονται με μηχανικό αερισμό με υψηλές πιέσεις, η μικρή ανοιχτή θωρακοτομή είναι η μέθοδος εκλογής γιατί μειώνει τις επιπλοκές και επιτρέπει τον καλύτερο χειρισμό τους.¹⁴

Η βιντεο-θωρακοσκοπική μέθοδος, φαίνεται να κερδίζει έδαφος καθώς αυξάνεται η εμπειρία πολλών κέντρων με τη συχνή χρήση της. Τα πλεονεκτήματα προέρχονται από την αποφυγή του χειρουργικού τραύματος και την ταχύτερη ανάρρωση του ασθενή. Σε μια προοπτική μελέτη μιας μικρής ομάδας παιδιών με διάχυτη πνευμονοπάθεια χωρίς ανοσοκαταστολή οι Fan και συν,¹⁵ διαπίστωσαν ότι το διαγνωστικό αποτέλεσμα της βιντεο-θωρακοσκοπικής βιοψίας (54%) ήταν παρόμοιο με εκείνο της ανοικτής βιοψίας (57%).

Η διαθωρακική βιοψία με βελόνη αναρρόφησης, έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci* (Carinii) σε παιδιά με κακοήθεια και για τη διάγνωση εντοπισμένης λοίμωξης σε ανοσοκατεσταλμένα παιδιά.¹⁶ Πνευμοθώρακας έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό 37%.

Η κατευθυνόμενη με αξονικό τομογράφο διαθωρακική βιοψία με βελόνη αναρρόφησης, βελτιώνει το αποτέλεσμα και την ασφάλεια και ίσως είναι η μέθοδος εκλογής σε μεγαλύτερα παιδιά με εντοπισμένες στην περιφέρεια αλλοιώσεις των πνευμόνων.¹⁷

Η διαβρογχική βιοψία μέσω βρογχοσκοπίου, χρησιμοποιείται για τη λήψη ιστολογικού υλικού τόσο σε πνευμονική βλάβη, όσο και σε ενδοβρογχική. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται και τα δύο είδη βρογχοσκοπίου, εύκαμπτο και άκαμπτο.¹⁸⁻²⁰ Σε διάχυτη πνευμονοπάθεια, η ταυτόχρονη χρήση ακτινοσκόπησης βελτιώνει τη δυνατότητα λήψης ιστολογικού υλικού από την επιθυμητή περιοχή και ταυτόχρονα μειώνει τις επιπλοκές, όπως ο τραυματισμός του υπεζωκότα. Το βρογχοσκόπιο εισέρχεται στον συγκεκριμένο βρόγχο και η λαβίδα βιοψίας διέρχεται μέσα από τον ειδικό αυλό και κατευθύνεται στην επιλεγείσα περιοχή. Η κλειστή λαβίδα προωθείται στο επιθυμητό βάθος, ανασύρεται ελαφρά, ανοίγεται και προωθείται πάλι, μέχρι να γίνει αντιληπτή ήπια αντίσταση πριν να συγκλεισθεί εκ νέου.²¹ Λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων που λαμβάνονται, της φύσεως των παθήσεων του παιδικού πνεύμονα, καθώς και για τεχνικούς λόγους, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σπανιότερα στα παιδιά σε σχέση με τους ενηλίκους. Οι ενδοβρογχικές αλλοιώσεις, αν και πολύ πιο σπάνιες και διαφορετικής φύσεως στα παιδιά απ' ότι στους ενηλίκους, είναι πιο εύκολα προσπελάσιμες με το βρογχοσκόπιο και δίνουν ικανοποιητική ποσότητα υλικού για βιοψία. Για τις ενδοβρογχικές αλλοιώσεις, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται το άκαμπτο βρογχοσκόπιο που επιτρέπει τη χρήση μεγαλύτερης λαβίδας βιοψίας, επειδή η ποσότητα του ιστού που θα ληφθεί είναι μεγαλύτερη. Επίσης, επειδή η πιθανότητα αιμορραγίας είναι σημαντική, το άκαμπτο βρογχοσκόπιο επιτρέπει τον καλύτερο έλεγχο της αιμορραγίας.



Εικόνα 1. Ανοικτή βιοψία πνεύμονος.

Αν και η βιοψία πνεύμονα είναι η τελική διαγνωστική διαδικασία και θα διενεργηθεί αφού έχουν εξαντληθεί όλα τα υπόλοιπα διαθέσιμα μέσα, σε ορισμένες περιπτώσεις όπως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με οξεία πνευμονοπάθεια, η κατάλληλη χρονική στιγμή της διενέργειας είναι δύσκολο να καθοριστεί, γιατί ο κλινικός γιατρός θέλει να δώσει χρόνο στην εμπειρική θεραπεία να δράσει. Ως γενικός κανόνας πρέπει να ισχύει ότι κάθε ασθενής που δεν ανταποκρίνεται στην αγωγή που

έχει αποφασισθεί με βάση όλα τα διαθέσιμα διαγνωστικά μέσα –συμπεριλαμβανομένης της βρογχοσκόπησης και του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος– θα πρέπει έγκαιρα να υποβάλλεται σε βιοψία πνεύμονος. Η έγκαιρη βιοψία εφαρμόζεται σε πολλά κέντρα και είναι ασφαλής αν διενεργηθεί πριν ο ασθενής επιβαρυνθεί και χρειαστεί μηχανική υποστήριξη αναπνοής, οπότε αυξάνεται ο κίνδυνος επιπλοκών.²²

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Οι επιπλοκές της βιοψίας πνεύμονα ποικίλουν ανάλογα με την τεχνική, αλλά οι συχνότερες είναι ο πνευμοθώρακας και η αιμορραγία. Ο κίνδυνος *πνευμοθώρακα* μετά από ενδοσκοπική διαβρογχική βιοψία είναι σχετικά μικρός και εξαρτάται εν μέρει από τη φύση της υποκείμενης πάθησης. Είναι μεγαλύτερος σε ασθενείς με αναπνευστική ή πολυοργανική ανεπάρκεια καθώς και όταν η ενδοτικότητα των πνευμόνων είναι ελαττωμένη. Η *αιμορραγία* στη διαβρογχική βιοψία μπορεί να είναι μαζική και να αποβεί θανατηφόρα. *Ατελεκτασία* είναι πιθανό να προκληθεί από πήγμα αίματος μετά από ενδοβρογχική βιοψία γι' αυτό απαιτείται καλός καθαρισμός των βρόγχων με αναρόφηση.²¹

Η πιθανότητα *λοίμωξης* στη διαβρογχική βιοψίας είναι παρόμοια με αυτή της βρογχοσκόπησης. Η *τρώση άλλου οργάνου* όπως του ήπατος είναι σπάνια και αποφεύγεται με τη χρήση ακτινοσκόπησης.

ΟΦΕΛΗ

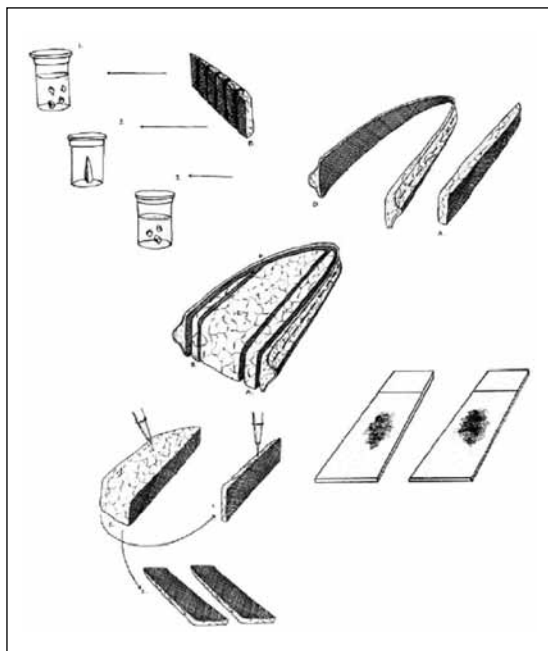
Παρά τα αναμενόμενα, η βιοψία πνεύμονα δεν είναι πάντοτε διαγνωστική. Οι λόγοι είναι ποικίλοι. Στη διαβρογχική και στη διαθωρακική βιοψία με βελόνη αναρρόφησης ενδέχεται η ποσότητα του ιστού να είναι μικρή ή να μην προέρχεται από την περιοχή της βλάβης. Ακόμη και σε ανοικτή βιοψία, η ποσότητα του ιστού και ο χειρισμός του δείγματος είναι καθοριστικοί παράγοντες για τη διάγνωση. Εάν λόγου χάριν οι βλάβες είναι κυρίως βρογχικές ή περιβρογχικές και το παρασκεύασμα είναι περιφερικό, και δεν περιλαμβάνει βρογχικό ιστό ή βρογχιόλια, το αποτέλεσμα είναι αμφίβολο. Είναι επίσης δύσκολη η ερμηνεία των ιστολογικών ευρημάτων σε περίπτωση που το δείγμα δεν έχει επαρκώς εκπτυχθεί ή αντιθέτως είναι υπερδιατεταμένο.

Λόγω της φύσης των διάχυτων παιδιατρικών πνευμονοπαθειών η διαγνωστική αξία της βιοψίας πνεύμονα, τουλάχιστον για την κατηγοριοποίηση της υποκείμενης πάθησης με βάση τις τελευταίες επιστημονικές εξελίξεις, ανέρχεται σε ποσοτό 88%.²³ Σε πνευμονικές λοιμώξεις σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς τα ποσοστά διάγνωσης κυμαίνονται από 36 μέχρι 95%.²⁴

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ο χειρισμός του ιστού που λαμβάνεται από ασθενείς με διάχυτη παρεγχυματική πνευμονοπάθεια, ιδιαίτερα στην ανοικτή ή θωρακοσκοπική βιοψία πνεύμονα, είναι καθοριστικός για την περαιτέρω μελέτη και την άντληση των απαραίτητων πληροφοριών. Οι Langston και συν, εκπόνησαν αναλυτικό πρωτόκολλο σχετικά με τον χειρισμό του ιστολογικού υλικού σε τέτοιους παιδιατρικούς ασθενείς.²⁵ Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει σειρά από διαδικασίες που περιγράφονται περιληπτικά στη συνέχεια. (Εικόνα 2)

Το τεμάχιο ή τα τεμάχια του πνευμονικού ιστού πρέπει να τοποθετηθούν σε αποστειρωμένο δοχείο και να τεμαχιστούν από τον παθολογοανατόμο. Ο μεγαλύτερος αριθμός



Εικόνα 2. Γραφική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου χειρισμού της βιοψίας πνεύμονος. Τα τεμάχια A και D αποστέλλονται για καλλιέργεια. Το τεμάχιο B διαιρείται σε 3 μέρη (B-1 για καλλιέργεια ιών, το B-2 καταψύχεται, το B-3 μονιμοποιείται με γλουταραλδεΐδη για μελέτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο). Από το τεμάχιο C λαμβάνονται τα εντυπώματα. Μετά από αυτό ένα μικρό τμήμα του, το C-1 εκπύσσεται με cryomatrix/sucrose. Το υπόλοιπο C-2 εκπύσσεται με έγχυση φορμαλδεΐδης και στη συνέχεια τεμαχίζεται για μελέτη με κοινό μικροσκόπιο (από Langston C, et al²⁵).

πληροφοριών λαμβάνεται από τομές κάθετες προς την υπεζωκοτική επιφάνεια του ιστοτεμαχίου. Η μελέτη του ιστολογικού υλικού μπορεί να περιλαμβάνει μέρος ή όλα τα ακόλουθα:

- Μικροβιολογικές καλλιέργειες (μικρόβια, ιοί, μυκοβακτηρίδια, μύκητες)
- Μελέτη με PCR ή άλλες μοριακές μελέτες
- Μελέτη ανοσοφθορισμού ή Laser capture (το δείγμα χρειάζεται βαθιά κατάψυξη)
- Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (το δείγμα μονιμοποιείται σε γλουταραλδεΐδη)
- Κυτταρολογική εξέταση ή ταχεία ταυτοποίηση μικροβίων σε εντυπώματα σε μικροσκόπιο (3 δείγματα μονιμοποιημένα σε αλκοόλη και 3 σε στεγνό αέρα)
- Μελέτη με κοινό μικροσκόπιο (το δείγμα κατάλληλα εκπτυγμένο και μονιμοποιημένο σε φορμαλδεΐδη).

Ιδιαίτερα τα τεμάχια που προορίζονται για εξέταση στο κοινό μικροσκόπιο πρέπει να μονιμοποιούνται αφού πρώτα γίνει ήπια διάταση με φορμαλδεΐδη. Αυτό γίνεται με τη χρήση σύριγγας και βελόνας ινσουλίνης, γεμισμένης με φορμαλδεΐδη, με την οποία διενεργείται έγχυση υποϋπεζωκοτικά στο δείγμα, με πολύ

ελαφρά πίεση. Η διάταση που θα προκύψει είναι προφανής, όπως και η διαρροή μικρής ποσότητας υγρού από τις επιφάνειες τομής.

Στη μελέτη των δειγμάτων με το κοινό μικροσκόπιο θα χρησιμοποιηθούν κατάλληλες χρώσεις για μικροοργανισμούς καθώς και για τα κύρια δομικά στοιχεία ή και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για ταυτοποίηση συγκεκριμένων στοιχείων.

Για τα κύρια δομικά στοιχεία του πνευμονικού παρεγχύματος, δεν υπάρχει αυστηρός κατάλογος χρώσεων αλλά η πεντάχρωμη ιστοχημική Movat και η τριχρωμή Mason ή Elastica είναι οι συνήθως χρησιμοποιούμενες χρώσεις.

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για την ανίχνευση κερατίνης 7 και Thyroid Transcription Factor-1 (TGF-1) συμβάλλουν στην ανάδειξη των πνευμονιοκυττάρων, ενώ οι χρώσεις για την ανίχνευση ακτίνης, λείων μυικών ινών και δεσμίνης επισημαίνουν τυχόν μεσοκυψελιδική ίνωση. Επιπλέον, η χρήση αντισωμάτων χρωμογρανίνης A και Bombesin, συμβάλλει στην αξιολόγηση τυχόν αύξημένου αριθμού νευροενδοκρινικών κυττάρων.

Σχετικά με τα αποτελέσματα της βιοψίας πνεύμονος σημειώνεται ότι για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα απαιτείται η συνεργασία του παιδοπνευμονολόγου, του χειρουργού,

του απεικονιστή και του παθολογοανατόμου, ιδιαίτερα σε διάχυτες πνευμονικές αλλοιώσεις. Η μελέτη της βιοψίας συνιστάται να διενεργείται από παθολογοανατόμο με εμπειρία στις παιδιατρικές παθήσεις των πνευμόνων, διότι ο φυσιολογικός πνεύμονας του βρέφους διαφέρει από αυτόν του μεγαλύτερου παιδιού και του εφήβου. Έτσι τα παθολογικά ευρήματα πρέπει να ερμηνεύονται υπό το πρίσμα των φυσιολογικών παραμέτρων και της ευρύτερης ποικιλίας στην διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων που εξαρτάται από την ηλικία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Coren ME, Nicholson AG, Goldstraw P, Rosenthal M, Bush A. Open lung biopsy for diffuse interstitial lung disease in children. *Eur Respir J* 1999; 14: 817-821.
2. Steinberg R, Freud E, Ben-Ari J, Schonfeld T, Golinsky D, Mor C, et al. Open lung biopsy – successful diagnostic tool with therapeutic implication in the critically ill paediatric population. *Acta Paediatr* 1998; 87: 945-948.
3. Gorenflo M. Open lung biopsy in patients with congenital heart disease. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1357-1358.
4. Inwald D, Brown K, Gensini F, Malone M, Goldman A. Open lung biopsy in neonatal and paediatric patients referred for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Thorax* 2004; 59: 328-333.
5. Lane JR, Siwik E, Preminger T, Stork E, Spector M. Prospective diagnosis of alveolar capillary dysplasia in infants with congenital heart disease. *Am J Cardiol* 1999; 84: 618-620, A9-10.
6. Deterding RR, Wagener JS. Lung biopsy in immunocompromised children: When, how, and who? *J Pediatr* 2000; 137: 147-149.
7. Imoke E, Dudgeon DL, Colombani P, Leventhal B, Buck JR, Haller JA. Open lung biopsy in the immunocompromised pediatric patient. *J Pediatr Surg* 1983; 18: 816-821.
8. Thomas JH, Farek PE, Hermreck AS, Pierce GE. Diagnostic value of open lung biopsy in immunocompromised patients. *Am J Surg* 1987; 154: 692-695.
9. Stefanutti D, Morais L, Fournet JC, Jan D, Casanova JL, Scheinmann P, et al. Value of open lung biopsy in immunocompromised children. *J Pediatr* 2000; 137: 165-171.
10. Cazzadori A, Di Perri G, Todeschini G, Luzzati R, Boschiero L, Perona G, et al. Transbronchial biopsy in the diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients. *Chest* 1995; 107: 101-106.
11. Janzen DL, Adler BD, Padley SP, Muller NL. Diagnostic success of bronchoscopic biopsy in immunocompromised patients with acute pulmonary disease: predictive value of disease distribution as shown on CT. *AJR Am J Roentgenol* 1993; 160: 21-24.
12. Temes RT, Joste NE, Allen NL, Crowell RE, Dox HA, Wernly JA. The lingula is an appropriate site for lung biopsy. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1016-1018; discussion 1018-1019.
13. Newman SL, Michel RP, Wang NS. Lingular lung biopsy: Is it representative? *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 1084-1086.
14. Kornecki A, Shemie SD. Open lung biopsy in children with respiratory failure. *Crit Care Med* 2001; 29: 1247-1250.
15. Fan LL, Kozinetz CA, Wojtczak HA, Chatfield BA, Cohen AH, Rothenberg SS. Diagnostic value of transbronchial, thoracoscopic, and open lung biopsy in immunocompetent children with chronic interstitial lung disease. *J Pediatr* 1997; 131: 565-569.
16. Cahill AM, Baskin KM, Kaye RD, Fitz CR, Towbin RB. CT-guided percutaneous lung biopsy in children. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 955-960.
17. Partrick DA, Bensard DD, Teitelbaum DH, Geiger JD, Strouse P, Harned RK. Successful thoracos-

- copic lung biopsy in children utilizing preoperative CT-guided localization. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 970-973; discussion 970-973.
18. Shure D. Transbronchial biopsy and needle aspiration. *Chest* 1989; 95: 1130-1138.
 19. Fitzpatrick S, Stokes D, Marsh B, Wang K. Transbronchial lung biopsy in pediatric and adolescent patients. *Am J Dis Child* 1985; 139: 46-49.
 20. Kurland G N, Jaffe R, Atlas AB, Armitage J, Orenstein DM. Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy in children following heart-lung and lung transplantation. *Chest* 1993; 104: 1043-1048.
 21. Wood R. Diagnostic and therapeutic procedures in pediatric pulmonary patients. In: Taussig LM, Landau LI, editors. *Pediatric respiratory medicine*. St Louis: Mosby; 1999. p. 244-262.
 22. Foglia RP, Shilyansky J, Fonkalsrud EW. Emergency lung biopsy in immunocompromised pediatric patients. *Ann Surg* 1989; 210: 90-92.
 23. Deutsch GH, Young LR, Deterding RR, Fan LL, Dell SD, Bean JA, et al. Diffuse lung disease in young children: Application of a novel classification scheme. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 1120-1128.
 24. Stokes D. Pulmonary infections in the immunocompromised pediatric host. In: Chernick V, Boat TF, Wilmott RW, Bush A (editors). *Kendig's disorders of the respiratory tract in children*, 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 453-462.
 25. Langston C, Patterson K, Dishop MK, Askin F, Baker P, Chou P, et al. A protocol for the handling of tissue obtained by operative lung biopsy: Recommendations of the child pathology co-operative group. *Pediatr Dev Pathol* 2006; 9: 173-180.

Ανάλυση και αξιολόγηση υπεζωκοτικού υγρού

Α. Αττιλάκος, Π. Νικολαΐδου-Καρπαθίου

Ο υπεζωκότας είναι ορογόνος υμένας με ελαστικές ιδιότητες. Αποτελείται από δύο πέταλα: το περισπλάχνιο και το περίτονο. Το περισπλάχνιο πέταλο καλύπτει τους πνεύμονες, ενώ το περίτονο καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα του θωρακικού κλωβού, το μεγαλύτερο μέρος του μεσοθωράκιου και το διάφραγμα. Ανάμεσα στα δύο πέταλα σχηματίζεται η υπεζωκοτική κοιλότητα, που φυσιολογικά περιέχει μικρή ποσότητα υγρού (0,3 ml/kg βάρους σώματος), το οποίο ονομάζεται υπεζωκοτικό. Το υγρό εισέρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα δια των τριχοειδών του περιτόνου πετάλου και απορροφάται δια των λεμφαγγείων και των δύο πετάλων του υπεζωκότα.¹

Η σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού διαφέρει απ' αυτή του διάμεσου υγρού και του πλάσματος. Φυσιολογικά, διαθέτει χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης (1-1,5 g/dl) και περιέχει ως 100 κύτταρα/μL, τα οποία είναι κυρίως λεμφοκύτταρα. Σε σχέση με τον ορό αίματος έχει χαμηλότερη συγκέντρωση νατρίου και χλωρίου, υψηλότερη συγκέντρωση διττανθρακικών και περίπου τα ίδια επίπεδα pH, γλυκόζης και καλίου.²

ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗΣΥΛΛΟΓΗ

Η παρουσία στην υπεζωκοτική κοιλότητα μεγαλύτερης ποσότητας υγρού καλείται υπεζωκοτική συλλογή και αποτελεί συχνή εκδήλωση νοσημάτων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, αλλά και άλλων, συστηματικών και μη, νοσημάτων.³ Υπεζωκοτική συλλογή προκύπτει όταν ο ρυθμός παραγωγής του υπεζωκοτικού υγρού υπερτερεί του ρυθμού απορρόφησής του. Στα παιδιά απαντάται σπανιότερα απ' ότι στους ενήλικους.³

Η κλινική εικόνα που προκαλεί ποικίλλει ανάλογα με το αίτιο και την ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού. Ενδέχεται να είναι ασυμπτωματική, να προβάλλει με αναπνευστική δυσχέρεια κατά την άσκηση αλλά και υπό συνήθεις συνθήκες ή και με πόνο στη σύστοιχη περιοχή. Τονίζεται ότι ο πόνος προσανατολίζει σε υπεζωκοτική συλλογή από μικροβιακό αίτιο.^{3,4}

Κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας τα τρία συχνότερα αίτια ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής στα παιδιά είναι η πνευμονία, οι συγγενείς καρδιοπάθειες και οι κακοήθειες. Περίπου 40-50% από τα παιδιά με μικροβιακή πνευμονία θα εμφανίσουν έστω και μικρή υπεζωκοτική συλλογή. Από τα παιδιά όμως αυτά, λιγότερο από 5% θα εμφανίσουν εμπύημα. Από μελέτες προκύπτει ότι στην τρέχουσα δεκαετία δεκαπλασιάστηκε η συχνότητα των εμπυημάτων, ενώ παραμένει αμετάβλητη η συχνότητα των πνευμονιών.^{3,4}

Τύποι υπεζωκοτικής συλλογής

Οι υπεζωκοτικές συλλογές χωρίζονται σε διδρωματικές και εξιδρωματικές.^{3,5} Η ταξινόμηση αυτή αντανακλά διαφορές στη σύσταση, την αιτιολογία και τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της συλλογής.

Διδρωματική υπεζωκοτική συλλογή δημιουργείται όταν οι υδροστατικές ή και οι κολλοειδωσμητικές πιέσεις εκατέρωθεν της υπεζωκοτικής μεμβράνης μεταβάλλονται, με αποτέλεσμα ο ρυθμός παραγωγής να υπερέχει του ρυθμού απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού. Χαρακτηρίζεται από μικρό αριθμό κυττάρων και χαμηλή στάθμη λευκώματος. Η ανάπτυξη διδρωματικής υπεζωκοτικής συλλογής υποδηλώνει ότι η υπεζωκοτική μεμβράνη είναι φυσιολογική και ότι η συλλογή θα επαναπορροφηθεί μόλις διορθωθεί το υποκείμενο νόσημα. Κλασικοί εκπρόσωποι αυτού του τύπου είναι οι υπεζωκοτικές συλλογές σε καρδιακή κάμψη και κίρρωση του ήπατος.

Εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή δημιουργείται όταν, λόγω σηπτικής ή άσηπτης φλεγμονής της επιφάνειας των πετάλων του υπεζωκότα, αυξάνεται η παραγωγή υπεζωκοτικού υγρού ή και παρακωλύεται η αποχέτευσή του από αποφραγμένα λεμφαγγεία. Ακόμη, ο τραυματισμός του υπεζωκότα και η δυσπλασία ή η κάκωση των λεμφαγγείων της περιοχής μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή. Το εξιδρωματικό υγρό είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη και κύτταρα. Η υπεζωκοτική συλλογή από λοιμώδη αίτια είναι πάντοτε εξιδρωματική. Λοιμώδεις παράγοντες που την προκαλούν είναι κυρίως κοινά μικρόβια (πνευμονιόκοκκος, σταφυλόκοκκος και αιμόφιλος της γρίπης) και το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης και λιγότερο συχνά το μυκόπλασμα, τα χλαμύδια και ιοί. Επειδή η υπεζωκοτική συλλογή αναπτύσσεται στο έδαφος πνευμονίας η συλλογή χαρακτηρίζεται και ως παραπνευμονιακή.^{3,5}

Τα κυριότερα αίτια διδρωματικής και εξιδρωματικής πλευριτικής συλλογής δίνονται στον Πίνακα 1.⁴

Διάκριση εξιδρωματικής από διδρωματική

Για το διαχωρισμό της εξιδρωματικής από τη διδρωματική υπεζωκοτική συλλογή χρησιμοποιούνται τα κριτήρια των Light και συν (1972).⁵ Σύμφωνα με αυτά, εξίδρωμα χαρακτηρίζεται το υπεζωκοτικό υγρό που πληροί τουλάχιστο ένα από τα ακόλουθα κριτήρια:

- Πρωτεΐνη υπεζωκοτικού υγρού / πρωτεΐνη ορού αίματος >0,5
- LDH υπεζωκοτικού υγρού / LDH ορού αίματος >0,6
- Στάθμη LDH υπεζωκοτικού υγρού >200 U/L (αργότερα τροποποιήθηκε σε: LDH υπεζωκοτικού υγρού >2/3 του ανώτερου

Πίνακας 1. Αίτια υπεζωκοτικής συλλογής.

Δίδρωμα

Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια
Νεφρωσικό σύνδρομο
Κίρρωση του ήπατος
Υπολευκωματιναιμία
Περιτοναϊκή διάλυση
Ουροθώρακας
Ατελεκτασία
Υποθυρεοειδισμός
Απόφραξη άνω κοίλης φλέβας
Πνευμονική εμβολή
(ενδέχεται να είναι εξίδρωμα)

Εξίδρωμα

Μικροβιακές λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος
Ιογενείς λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος
Πνευμονική εμβολή
Ρήξη οισοφάγου
Χυλοθώρακας
Ψευδοχυλοθώρακας
Παγκρεατίτιδα
Νοσήματα του συνδετικού ιστού
Αιμοθώρακας
Κακοήθειες

φυσιολογικού ορίου της στον ορό).

Τα ευρήματα της μελέτης των Light και συν⁵ υποστήριζαν ότι τα κριτήρια που εφάρμοσαν χαρακτηρίζονταν από πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (99% και 98%, αντίστοιχα). Σημειώνεται ότι η μελέτη των Light και συν⁵ έγινε αποκλειστικά σε ενήλικους, ενώ τα κριτήρια δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί στον παιδικό πληθυσμό. Φαίνεται, όμως, πως και στα παιδιά η ευαισθησία και η ειδικότητα των κριτηρίων αυτών είναι υψηλές (έως 100% και 90% αντίστοιχα).⁶

Μερικές μεταγενέστερες προοπτικές μελέτες σε ενήλικους έδειξαν ότι, ενώ τα ποσοστά ευαισθησίας των κριτηρίων ήταν όντως πολύ υψηλά, τα ποσοστά ειδικότητας ήταν σημαντικά χαμηλότερα (65-86%).⁷ Με βάση τα αποτελέσματα αυτά μερικοί ερευνητές για να επιτύχουν ασφαλέστερο διαχωρισμό της εξιδρωματικής από τη διιδρωματική συλλογή μελέτησαν στο υπεζωκοτικό υγρό και άλλους δείκτες, όπως τη χολερυθρίνη, τη χοληστερόλη και την αλβουμίνη. Με το πέρασμα όμως του χρόνου φάνηκε ότι τα κριτήρια των Light και συν⁵ παραμένουν οι πιο αξιόπιστοι δείκτες για τη διάκριση των εξιδρωμάτων από τα διιδρώματα. Κύριο μειονέκτημά τους είναι ότι υπό ειδικές συνθήκες μερικά διιδρώματα χαρακτηρίζονται ως εξιδρώματα. Αυτό για παράδειγμα συμβαίνει με το διίδρωμα σε ασθενείς που παίρνουν διουρητικά. Όταν το ιστορικό και η κλινική εξέταση του ασθενούς συνηγορούν υπέρ διιδρώματος, ενώ τα κριτήρια των Light και συν⁵ συνηγορούν για εξίδρωμα, η διαφορά της στάθμης της αλβουμίνης ανάμεσα στον ορό αίματος και το υπεζωκοτικό υγρό χρησιμεύει για την ένταξη του υπό εξέταση υγρού στο ένα από τα δύο. Συγκεκριμένα, όταν η διαφορά της συγκέντρωσης είναι μεγαλύτερη από 1,2 g/dl, η υπεζωκοτική συλλογή κατατάσσεται στα διιδρώματα.⁸

Η διάκριση του υπεζωκοτικού υγρού σε διίδρωμα ή εξίδρωμα καθορίζει την περαιτέρω διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση του άρρωστου παιδιού. Εάν αποδειχθεί ότι ο ασθενής έχει διιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή, δεν υπάρχει ανάγκη για περισσότερες εξετάσεις και ο παιδίατρος προχωρεί στη θεραπευτική αντιμετώπιση της υποκείμενης νόσου, η οποία θα βοηθήσει στην απορρόφηση του διιδρώματος. Εάν όμως ο ασθενής έχει εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή, χρειάζεται να γίνουν συμπληρωματικές εξετάσεις στο υπεζωκοτικό υγρό για να προσδιορισθεί η αιτιολογία της. Οι διαφορές μεταξύ διιδρωματικής και εξιδρωματικής υπεζωκοτικής συλλογής δείχνονται στον Πίνακα 2.⁴

ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Γενικού ενδιαφέροντος

Η ανάλυση του υπεζωκοτικού υγρού προσφέρει πολύτιμη βοήθεια στην εξακρίβωση της αιτίας που προκάλεσε την υπεζωκοτική συλλογή (Πίνακας 3).^{7,9}

Η μακροσκοπική εμφάνιση του υπεζωκοτικού υγρού παρέχει χρήσιμες πληροφορίες αναφορικά με την αιτιολογία της υπεζωκοτικής συλλογής.⁹ Εξετάζονται το χρώμα, η θολερότητα, η γλοιότητα και η οσμή του υπεζωκοτικού υγρού. Η κλινική σημασία διαφόρων μακροσκοπικών χαρακτήρων του υπεζωκοτικού υγρού δείχνεται στον Πίνακα 4.

Παράμετροι που εξετάζονται στο υπεζωκοτικό υγρό είναι κυρίως: 1) η πρωτεΐνη, 2) η γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH), 3) η γλυκόζη, 4) το pH, 5) ο αριθμός και ο τύπος των λευκοκυττάρων και 6) ο αριθμός των ερυθροκυττάρων.

Πρωτεΐνη υπεζωκοτικού υγρού

Η στάθμη της στο υπεζωκοτικό υγρό, όπως ήδη αναφέρθηκε χρησιμεύει για τη διάκριση

Πίνακας 2. Διαφορές μεταξύ διιδρωματικής και εξιδρωματικής υπεζωκοτικής συλλογής.

<i>Υπεζωκοτικό υγρό</i>	<i>Διίδρωμα</i>	<i>Εξίδρωμα</i>
pH	> 7,4	<7,3
Πρωτεΐνη (g/dL)	< 3,0	>3,0
LDH (IU/L)	<2/3 ορού	>2/3 ορού
Πρωτεΐνη υπεζωκοτικού υγρού/ πρωτεΐνη ορού	< 0,5	>0,5
LDH υπεζωκοτικού υγρού/ LDH ορού	<0,6	>0,6
Ερυθροκύτταρα (ανά mm ³)	<5.000	>5.000
Λευκοκύτταρα (ανά mm ³)	<1.000	>1.000
Γλυκόζη (mg/dL)	όπως στον ορό	< του ορού

της εξιδρωματικής από τη διιδρωματική συλλογή.

Γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH)

Η στάθμη της είναι αυξημένη στο εξίδρωμα και πολύ περισσότερο στο εμπύημα. Χρησιμεύει έτσι, εναλλακτικά με την αυξημένη πρωτεΐνη στη διάκριση του εξιδρώματος από το διίδρωμα.

Γλυκόζη υπεζωκοτικού υγρού

Στη διαφορική διάγνωση εξιδρωματικών συλλογών συχνά χρησιμοποιείται η τιμή της γλυκόζης του υπεζωκοτικού υγρού. Χαμηλή στάθμη γλυκόζης (<60 mg/dL) ανευρίσκεται σε ασθενείς με υπεζωκοτική συλλογή στο έδαφος μικροβιακής (διήθηση του υπεζωκοτικού ιστού από λοιμώδες αίτιο) ή φυματιώδους λοίμωξης, κακοήθειας, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, συστηματικού ερυθρεματώδους λύκου και ρήξης του οισοφάγου. Τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης του υπεζωκοτικού υγρού αποδίδονται σε αυξημένη γλυκόλυση από τα φλεγμονώδη κύτταρα του υπεζωκοτικού υγρού και τα βακτήρια, από το φλεγμαίνοντα υπεζωκοτικό ιστό, όπως επίσης από την ελαττωμένη είσοδο γλυκόζης από το αίμα στο υπεζωκοτικό υγρό. Τα χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης παρατηρούνται στο εμπύημα και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Έτσι, στο εμπύημα

Πίνακας 3. Ανάλυση υπεζωκοτικού υγρού.

Μακροσκοπική εμφάνιση

Βιοχημικές εξετάσεις

πρωτεΐνη
γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH)
γλυκόζη
pH

Ανάλυση κυττάρων

μέτρηση ερυθροκυττάρων
μέτρηση λευκοκυττάρων και τύπος

Μικροβιολογική εξέταση (σε υποψία λοίμωξης)

χρώση κατά Gram
καλλιέργειες για αερόβια και αναερόβια
χρώση και καλλιέργεια για μύκητες
(σε υποψία μυκητιασικής λοίμωξης)
χρώση και καλλιέργεια για μυκοβακτηρίδια
(σε υποψία μυκοβακτηριδιακής λοίμωξης)

Κυτταρολογική εξέταση (σε υποψία κακοήθειας)

Άλλες εξετάσεις (επί σχετικών ενδείξεων)

αμυλάση
λιπίδια
δείκτες φυματιώδους λοίμωξης
ανοσολογικός έλεγχος

Πίνακας 4. Κλινική σημασία της μακροσκοπικής εμφάνισης του υπεζωκοτικού υγρού.

<i>Εμφάνιση</i>	<i>Κλινική σημασία</i>
Διαυγές ή αχυρόχρουν	Διίδρωμα
Θολερό	Εξίδρωμα
Πυώδες	Εμπύημα
Αιματηρό	Κακοήθεια, τραύμα, πνευμονική εμβολή, λοίμωξη
Γαλακτώδες	Χυλοθώρακας, ψευδοχυλοθώρακας
Σοκολατόχρουν	Λοίμωξη από αμοιβάδα
Μαύρο χρώμα	Λοίμωξη από ασπέργιλλο
Κιτρινοπράσινο χρώμα	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Πράσινο χρώμα	Χολοθώρακας
Κοπρανώδης οσμή	Εμπύημα από αναερόβια μικρόβια
Οσμή αμμωνίας	Ουροθώρακας

η στάθμη της γλυκόζης στο υπεζωκοτικό υγρό ενδέχεται να είναι ακόμη και μηδενική, ενώ η στάθμη της στο υγρό της ρευματοειδούς πλευρίτιδας είναι $<30 \text{ mg/dL}$.^{9,10}

pH υπεζωκοτικού υγρού

Θεωρείται ο καλύτερος δείκτης φλεγμονής του υπεζωκοτικού ιστού και πρέπει να μετριέται με την ίδια προσοχή όπως και το αρτηριακό pH. Το υγρό πρέπει να συλλέγεται αναεροβίως σε ηπαρινισμένη σύριγγα και το pH να προσδιορίζεται σε αναλυτή αερίων. Τιμή pH στο υπεζωκοτικό υγρό $<7,3$ υποδηλώνει εξιδρωματική συλλογή και απαντάται σε συλλογές από κοινά βακτήρια, φυματίωση, κακοήθεια, ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο ή ρήξη του οισοφάγου. Τονίζεται ότι η ρήξη οισοφάγου είναι η μόνη αιτία που μπορεί να δώσει τιμή pH κοντά στο 6. Σε γενικές γραμμές, το υπεζωκοτικό υγρό με χαμηλό pH έχει επίσης χαμηλή γλυκόζη και υψηλή στάθμη LDH.¹⁰

Σε ενήλικους ασθενείς με εξιδρωματική συλλογή από βακτήρια η χαμηλή τιμή του pH στο υπεζωκοτικό υγρό ($<7,2$) υποδηλώνει την ανάγκη παροχέτευσης. Στα παιδιά η απόφαση για θωρακοκέντηση και παροχέτευση βασίζεται και σε κλινικά κριτήρια, όπως η συνέχιση του πυρετού παρά την κατάλληλη αντιβιοτική αγωγή και η παρουσία μεγάλης συλλογής που προκαλεί αναπνευστική δυσχέρεια.^{4,11} Η διάκριση της λοιμώδους εξιδρωματικής συλλογής σε μη επιπλεγμένη, επιπλεγμένη και σε εμπύημα με βάση τα ευρήματα στο υπεζωκοτικό υγρό δείχνεται στον Πίνακα 5.^{4,12} Με γνώμονα τα ευρήματα αυτά, τιμή pH $<7,2$, γλυκόζης $<40 \text{ mg/dl}$ και LDH $>1000 \text{ IU/L}$, προσανατολίζουν σε παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού.^{3,12}

Αμυλάση υπεζωκοτικού υγρού

Αυξημένα επίπεδα αμυλάσης στο υπεζωκοτικό υγρό (αμυλάση υπεζωκοτικού υγρού / αμυλάση ορού >1) ανευρίσκονται σε ασθενείς με οξεία ή χρόνια παγκρεατίτιδα, ρήξη του οισοφάγου και λιγότερο συχνά (10%) σε κακοήγη νοσήματα. Στη χρόνια παγκρεατίτιδα η στάθμη της αμυλάσης στο υπεζωκοτικό υγρό συχνά υπερβαίνει τις 100.000 IU/L , ενώ στη ρήξη του οισοφάγου και στα κακοήγη νοσήματα αυξάνεται το σιαλικό ισοένζυμό της. Σπάνια, ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα αμυλάσης στο υπεζωκοτικό υγρό σε ασθενείς με

Πίνακας 5. Διάκριση των παραπνευμονιακών συλλογών με βάση τα ευρήματα στο υπεζωκοτικό υγρό.

	<i>Μη επιπλεγμένη</i>	<i>Επιπλεγμένη</i>	<i>Εμπύημα</i>
Παρουσία πύου	-	-	+
Χρώση Gram	-	+/-	+/-
Καλλιέργεια	-	+/-	+/-
pH	>7,3	<7,2	<7,2
γλυκόζη (mg/dL)	>60	<40	<40
LDH (IU/L)	<1.000	>1.000	>1.000

μικροβιακές ή από κίρρωση υπεζωκοτικές συλλογές. Σήμερα, συνιστάται η αμυλάση του υπεζωκοτικού υγρού να μετρείται μόνο σε υποψία οξείας ή χρόνιας παγκρεατικής νόσου ή ρήξης οισοφάγου.^{9,10}

Ανάλυση κυττάρων υπεζωκοτικού υγρού

Ερυθρά αιμοσφαίρια

Για τη μέτρηση των κυττάρων, το υπεζωκοτικό υγρό τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει αντιπηκτικό.

Για να αποκτήσει το υπεζωκοτικό υγρό κόκκινη απόχρωση πρέπει ο αριθμός των ερυθροκυττάρων να είναι της τάξεως των 5.000-6.000/mm³. Στην περίπτωση που το υπεζωκοτικό υγρό φαίνεται αιματηρό πρέπει να μετρείται ο αιματοκρίτης. Εάν υπερβαίνει το 50% του αιματοκρίτη του αίματος, η υπεζωκοτική συλλογή χαρακτηρίζεται ως *αιμοθώρακας*. Η παρουσία αιματηρού υπεζωκοτικού υγρού (συνήθως ερυθροκύτταρα >100.000/μL) προσανατολίζει σε: κακοήθεια, τραύμα, πνευμονική εμβολή ή σπανιότερα λοίμωξη.⁹

Μερικές φορές γεννιέται το ερώτημα εάν το αίμα προϋπήρχε ή οφείλεται στη θωρακοκέντηση. Στην πρώτη περίπτωση η αιματηρή χροιά είναι ομοιόμορφη στο υγρό της σύριγγας αναρρόφησης, δεν ανευρίσκονται αιμοπετάλια και τα μακροφάγα του υγρού περιέχουν έγκλειστα αιμοσιδηρίνης.

Λευκά αιμοσφαίρια

Ο συνολικός αριθμός των λευκοκυττάρων του υπεζωκοτικού υγρού δεν προσφέρεται ιδιαίτερα για τη διαφορική διάγνωση. Συνήθως, οι διίδρωματικές συλλογές έχουν αριθμό λευκοκυττάρων <1000/mm³, ενώ τα περισσότερα εξιδρώματα έχουν λευκοκύτταρα >1000/mm³.

Για τον προσδιορισμό της αιτιολογίας της υπεζωκοτικής συλλογής είναι χρήσιμος ο τύπος των λευκοκυττάρων. Αριθμός λεμφοκυττάρων >50% του συνόλου των λευκοκυττάρων απαντάται σε κακοήθειες, φυματίωση, ρευματοειδή αρθρίτιδα, σύνδρομο κίτρινων ονύχων, σαρκοείδωση, χυλοθώρακα και ουροθώρακα. Επικράτηση των ουδετεροφίλων (με συνολικό αριθμό λευκοκυττάρων >10.000/mm³) απαντάται σε μικροβιακή υπεζωκοτική συλλογή, οξεία παγκρεατίτιδα, πνευμονική εμβολή, συστηματικό ερυθρεματοειδές και στο αρχικό στάδιο της φυματιώδους προσβολής του υπεζωκότα.^{9,10}

Αριθμός ηωσινοφίλων >10% του συνόλου των λευκοκυττάρων παρατηρείται συνήθως σε τραύματα του υπεζωκότα, πρόσφατο αιμοθώρακα ή πνευμοθώρακα, πνευμονική εμβολή,

λοίμωξη από παράσιτα (π.χ. αμοιβάδωση) ή μύκητες (π.χ. ιστοπλάσμωση, κοκκidioειδομύκωση) και μετά από λήψη φαρμάκων (π.χ. νιτροφουραντοΐνης).

Αριθμός βασηοφίλων > 10% του συνόλου των λευκοκυττάρων ανευρίσκεται σε λευχαιμική διήθηση του υπεζωκότα.^{3,10}

Ειδικού ενδιαφέροντος

Μικροβιολογική εξέταση υπεζωκοτικού υγρού

Σε υποψία λοίμωξης ή σε αδιάγνωστους ασθενείς το εξιδρωματικό υπεζωκοτικό υγρό πρέπει να υπόκειται σε χρώση κατά Gram και να καλλιεργείται για βακτήρια (αερόβια και αναερόβια). Ειδικές χρώσεις και καλλιέργειες για μυκοβακτηρίδια και μύκητες συνιστώνται όταν υπάρχει αντίστοιχη κλινική υποψία. Ωστόσο, η διαγνωστική αξία των παραπάνω εξετάσεων εξαρτάται από τον αιτιολογικό παράγοντα της υπεζωκοτικής συλλογής, την έκταση της υπεζωκοτικής φλεγμονής και την προηγούμενη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων.^{4,9}

Οι καλλιέργειες του υπεζωκοτικού υγρού για κοινά βακτήρια είναι στην πλειονότητα των περιπτώσεων (>80%) στείρες, εξαιτίας της αντιμικροβιακής αγωγής που έχει προηγηθεί. Σε τέτοιους ασθενείς, για την ανεύρεση του αιτιολογικού παράγοντα έχουν χρησιμοποιηθεί νεότερες μέθοδοι όπως η συγκόλληση latex (latex agglutination) και η αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR). Σε πρόσφατη μελέτη 78 παιδιών με εμπύημα,¹³ η ανίχνευση αντιγόνου του πνευμονιοκόκκου στο πλευριτικό υγρό με τη μέθοδο latex, βρέθηκε να έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (90% και 95%, αντίστοιχα). Άλλη πρόσφατη μελέτη σε 37 παιδιά με πνευμονία έδειξε ότι η μέθοδος PCR μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην αιτιολογική διάγνωση παραπνευμονιακής συλλογής από πνευμονιόκοκκο, αιμόφιλο γρίππης και σταφυλόκοκκο (ευαισθησία μεθόδου 78%).¹⁴

Κυτταρολογική εξέταση υπεζωκοτικού υγρού

Σε υποψία κακοήθειας πρέπει να διενεργείται κυτταρολογική εξέταση του υγρού. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι χαμηλή (40-60%) και εξαρτάται από τον τύπο κυττάρων της υποκείμενης κακοήθειας, την έκταση της προσβολής του υπεζωκότα και τον όγκο του υπεζωκοτικού υγρού που αναλύεται. Η ευαισθησία αυξάνεται όταν ελέγχονται δύο ή περισσότερα διαφορετικά δείγματα και όταν στο υπεζωκοτικό υγρό προσδιορίζονται και καρκινικοί δείκτες (π.χ. CEA, CYFRA 21-1, CEA).⁷

Λιπίδια υπεζωκοτικού υγρού

Όταν η όψη του υπεζωκοτικού υγρού είναι γαλακτώδης, το δείγμα φυγοκεντρείται και εξετάζεται το υπερκείμενο υγρό. Εάν το υπερκείμενο υγρό είναι διαυγές, η θολερότητα αποδίδεται σε κύτταρα ή κυτταρικά συγκρίματα, όπως συμβαίνει στο εμπύημα. Εάν η θολερότητα στο υπερκείμενο υγρό παραμένει μετά τη φυγοκέντρηση, τότε αυτή αποδίδεται σε υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων, γεγονός που παραπέμπει σε χυλοθώρακα ή ψευδοχυλοθώρακα.

Ο χυλοθώρακας οφείλεται σε διαφυγή χυλού από τα λεμφαγγεία στον υπεζωκοτικό χώρο. Χαρακτηρίζεται από υψηλή στάθμη τριγλυκεριδίων (>110 mg/dL) και χαμηλή στάθμη χοληστερόλης (<200 mg/dL). Η ανεύρεση χυλομικρών στο υπερκείμενο υγρό επιβεβαιώνει τη διάγνωση του χυλοθώρακα.

Ο ψευδοχυλοθώρακας χαρακτηρίζεται από χαμηλή στάθμη τριγλυκεριδίων (<50

mg/dL) και υψηλή στάθμη χοληστερόλης (>200 mg/dL). Προκαλείται από τη μακρά παραμονή υπεζωκοτικής συλλογής, ειδικότερα φυματιώδους ή ρευματικής αιτιολογίας. Η ανεύρεση κρυστάλλων χοληστερόλης στο ίζημα επιβεβαιώνει τη διάγνωση του ψευδοχολοθώρακα.^{3,15}

Δείκτες φυματιώδους λοίμωξης στο υπεζωκοτικό υγρό

Η καλλιέργεια υπεζωκοτικού υγρού για μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης σε ασθενείς με φυματιώδη υπεζωκοτική συλλογή ασυνήθως αποβαίνει θετική (<40%). Για τη διάγνωση της προτείνονται και άλλες εξετάσεις στο υπεζωκοτικό υγρό, όπως η απαμινάση της αδενοσίνης (adenosine deaminase, ADA), η λυσοζύμη, η ιντερφερόνη-γ και η ανίχνευση του DNA του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης με τη μέθοδο PCR.^{7,16-18}

Η ADA είναι ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της αδενοσίνης σε ινοσίνη και παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων. Το ισοένζυμο της ADA-1 βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα, ενώ το ισοένζυμο ADA-2 βρίσκεται μόνο στα μονοκύτταρα. Η παρουσία της ADA στο υπεζωκοτικό υγρό φαίνεται πως προέρχεται κυρίως από τα μονοκύτταρα μακροφάγα. Η μέτρησή της στο υπεζωκοτικό υγρό είναι διαγνωστικά χρήσιμη, διότι η ADA στο φυματιώδες υπεζωκοτικό υγρό τείνει να είναι υψηλότερη (συνήθως >45-60 IU/L) σε σύγκριση με άλλα υπεζωκοτικά εξιδρώματα.^{7,16} Σε διάφορες μελέτες, η ευαισθησία της ADA στη διάγνωση της υπεζωκοτικής συλλογής φυματιώδους αιτιολογίας κυμαίνεται από 91-100%, ενώ η ειδικότητά της από 89-95%.⁷ Τιμές ADA μικρότερες από 40 IU/L πρακτικά αποκλείουν τη διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας. Ο προσδιορισμός του ισοενζύμου ADA-2 φαίνεται να αυξάνει τη διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου. Σημειώνεται ότι αυξημένες τιμές ADA συχνά ανευρίσκονται επίσης σε εμπύημα ή σε συλλογές που οφείλονται σε ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε αιματολογικές κακοήθειες (λέμφωμα, λευχαιμία).^{7,10}

Η λυσοζύμη είναι βακτηριολυτικό ένζυμο, που ανευρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα μακροφάγα. Για τη διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας έχει προταθεί ο λόγος: λυσοζύμη υπεζωκοτικού υγρού / λυσοζύμη ορού να είναι μεγαλύτερος από 1,2 (ευαισθησία 76-100%, ειδικότητα 85-93%).⁷ Η διαγνωστική ακρίβεια της μέτρησης της λυσοζύμης στο υπεζωκοτικό υγρό αυξάνεται όταν συνεκτιμάται και η τιμή της ADA (ευαισθησία και ειδικότητα έως 100% σε πληθυσμούς με αυξημένη συχνότητα φυματίωσης).¹⁹

Αποτελέσματα για τη διάγνωση της φυματιώδους πλευρίτιδας συγκρίσιμα με τον προσδιορισμό της ADA έχει δώσει και η μέτρηση της ιντερφερόνης-γ στο υπεζωκοτικό υγρό (τιμή >200 pg/ml). Η ιντερφερόνη-γ είναι κυτταροκίνη που παράγεται από τα ενεργοποιημένα CD4+ T λεμφοκύτταρα των ασθενών με φυματιώδη λοίμωξη. Οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν στο υπεζωκοτικό υγρό αυξημένες τιμές ADA, αλλά μη ανιχνεύσιμες τιμές ιντερφερόνης-γ.^{7,18}

Τέλος, το DNA του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης στο υπεζωκοτικό υγρό μπορεί να ανιχνευθεί με την εξέταση PCR. Η ανίχνευση του DNA του μυκοβακτηριδίου είναι έως 100% ειδική για τη διάγνωση της φυματιώδους υπεζωκοτικής συλλογής, όμως η αντίστοιχη ευαισθησία που έχει αναφερθεί είναι χαμηλότερη (50-100%), πιθανότατα εξαιτίας του χαμηλού αριθμού μυκοβακτηριδίων στο υπεζωκοτικό υγρό. Η ευαισθησία της μεθόδου φαίνεται πως αυξάνεται με τη συνεκτίμηση δεικτών όπως η τιμή της ADA και ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων του υπεζωκοτικού υγρού.¹⁶

Συνοπτικά, όταν η υπεζωκοτική συλλογή έχει αυξημένα επίπεδα ADA οφείλεται συνήθως

σε μικροβιακή (κυρίως εμπύημα) ή φυματιώδη λοίμωξη, ρευματοειδή αρθρίτιδα και αιματολογικές κακοήθειες. Εξιδρωματική συλλογή με υψηλά επίπεδα ADA και λεμφοκυτταρικό τύπο οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά σε φυματιώδη λοίμωξη ή αιματολογικές κακοήθειες. Για τη διάκριση των 2 τελευταίων παθολογικών καταστάσεων βοηθά ο προσδιορισμός του ισοενζύμου ADA-2 και της ιντερφερόνης-γ στο υπεζωκοτικό υγρό (αυξημένα σε φυματιώδη λοίμωξη). Χαμηλά επίπεδα ADA σε εξίδρωμα στο οποίο επικρατούν τα λεμφοκύτταρα θέτουν την υποψία κακοήθειας. Τέλος, υψηλά επίπεδα ADA σε εξίδρωμα στο οποίο επικρατούν τα ουδετερόφιλα είναι συμβατό με παραπνευμονιακή συλλογή και ειδικότερα εμπύημα.

Ανοσολογικός έλεγχος υπεζωκοτικού υγρού

Ασθενείς με υπεζωκοτική συλλογή που οφείλεται σε συστηματικό ερυθματώδη λύκο, μπορεί να έχουν αυξημένους τίτλους αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ΑΠΑ, >1:160-320 ή σχέση ΑΠΑ υπεζωκοτικού υγρού προς ΑΠΑ ορού >1) και ελαττωμένα επίπεδα συμπληρώματος στο υπεζωκοτικό υγρό. Ασθενείς με συλλογή που οφείλεται σε ρευματοειδή αρθρίτιδα συχνά έχουν αυξημένους τίτλους ρευματοειδούς παράγοντα (ΡΠ, >1:320) ή σχέση ΡΠ υπεζωκοτικού υγρού προς ΡΠ ορού >1 και ελαττωμένα επίπεδα συμπληρώματος στο υπεζωκοτικό υγρό. Όμως, η διαγνωστική αξία του ανοσολογικού ελέγχου του υπεζωκοτικού υγρού δεν έχει τεκμηριωθεί και η χρήση του στην κλινική πράξη είναι, προς το παρόν, περιορισμένη.⁹

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wang NS. Anatomy of the pleura. Clin Chest Med 1998; 19: 229-240.
2. Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. Eur Respir J 1997; 10: 219-225.
3. Efrati O, Barak A. Pleural effusions in the pediatric population. Pediatr Rev 2002; 23: 417-426.
4. Boyer DM. Evaluation and management of a child with a pleural effusion. Pediatr Emerg Care 2005; 21: 63-68.
5. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med 1972; 77: 507-513.
6. Kalayci AG, Górses N, Adam B, Albayrak D. Significance of pleural fluid cholesterol and beta-2 microglobulin levels for the differentiation of pleural effusions in childhood. Clin Pediatr 1996; 35: 353-358.
7. Segura RM. Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusions in children. Paediatr Respir Rev 2004; 5: S205-S212.
8. Roth BJ, O'Meara TF, Cragun WH. The serum-effusion albumin gradient in the evaluation of pleural effusions. Chest 1990; 98: 546-549.
9. Heffner JE. Pleural effusion: pleural fluid analysis, thoracentesis, biopsy, and chest tube. In: Encyclopedia of Respiratory Medicine, edited by Laurent GJ, Shapiro SD. Academic, 2006, p. 362-367.
10. Gilbert-Barness E, Barness LA. Pleural, pericardial and peritoneal effusions. In: Clinical use of pediatric diagnostic tests. 1st ed. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 793.
11. Beers SL, Abramo TJ. Pleural effusions. Pediatr Emerg Care 2007; 23: 330-334.
12. Utine GE, Ozcelik U, Yalcin E, Dogru D, Kiper N, Aslan A, et al. Childhood parapneumonic effusions: biochemical and inflammatory markers. Chest 2005; 128: 1436-1441.
13. Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR, Le Bourgeois M, Abachin E, Quesne G, et al. Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction,

- and pneumococcal antigen detection in pleural fluids. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1135-1140.
14. Menezes-Martins LF, Menezes-Martins JJ, Michaelsen VS, Aguiar BB, Ermel T, Machado DC. Diagnosis of parapneumonic pleural effusion by polymerase chain reaction in children. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1106-1110.
 15. Hillerdal G. Chylothorax and pseudochylothorax. *Eur Respir J* 1997; 10: 1157-1162.
 16. Mishra OP, Kumar R, Ali Z, Prasad R, Nath G. Evaluation of polymerase chain reaction and adenosine deaminase assay for the diagnosis of tuberculous effusions in children. *Arch Dis Child* 2006; 91: 985-989.
 17. Klockars N, Petterson T, Riska H, Hellstrom PE, Norhagen A. Pleural fluid lysozyme in human disease. *Arch Intern Med* 1979; 139: 73-77.
 18. Ribera E, Ocapa I, Martinez-Vazquez JM, Rossell M, Espapol T, Ruibal A. High levels of interferon-gamma in tuberculouspleural effusion. *Chest* 1988; 93: 308-311.
 19. Hernando HV, Masa Jimenez JF, Juncal LD, Garcia-Buela JP, Egana MTM, Bueso JF. Meaning and diagnostic value of determining the lysozyme level of pleural fluid. *Chest* 1987; 91: 342-345.

Δείκτες φλεγμονής στο αίμα σε νοσήματα αναπνευστικού

*Ε. Μιχαηλίδου, Π. Πασπαλάκη, Ε. Παπαδοπούλη,
Ε. Μαντζουράνη, L. Donato*

Η πλειονότητα των αναπνευστικών νοσημάτων της παιδικής ηλικίας αντιμετωπίζεται εξωνοσοκομειακά και συνήθως η διαγνωστική και θεραπευτική τους προσέγγιση είναι εμπειρική. Ωστόσο, η ακριβέστερη διάγνωση, η αξιολόγηση της βαρύτητας και η διάκριση της ιογενούς από τη βακτηριακή λοίμωξη του αναπνευστικού μπορεί να έχουν ιδιαίτερη σημασία τόσο για κλινικούς όσο και επιδημιολογικούς λόγους.

Τα παιδιά με αναπνευστικά νοσήματα μπορεί να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες. Στην *πρώτη* υπάγονται παιδιά, τα περισσότερα, που το ιστορικό και η φυσική εξέταση επιτρέπουν την ασφαλή διάγνωση, χωρίς τη βοήθεια του εργαστηρίου. Στη *δεύτερη* υπάγονται εκείνα με σοβαρά ή ταχέως επιδεινούμενα νοσήματα που η προτεραιότητα δίδεται σε επείγοντες χειρισμούς διάσωσης και όχι, αρχικά τουλάχιστον, στην αναζήτηση δεικτών φλεγμονής. Τέλος στο 15-20% των παιδιών η κλινική εκτίμηση και η πληροφορία από το ιστορικό δεν αρκεί για τη διάγνωση συγκεκριμένης αναπνευστικής νόσου και η αναζήτηση και αξιολόγηση δεικτών φλεγμονής παίζει πρωτεύοντα διαγνωστικό και θεραπευτικό ρόλο.^{1,2}

Ο ΙΔΑΝΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Οι περισσότεροι δείκτες φλεγμονής είναι ενδιάμεσοι μεσολαβητές που συμμετέχουν στον καταρράκτη της φλεγμονώδους ανοσιακής απάντησης. Δυστυχώς η παρουσία και αύξηση των συγκεντρώσεων των περισσότερων από αυτούς στους ιστούς αντανάκλα τη φλεγμονή και όχι την αιτιολογία της. Λοιμώδεις και μη λοιμώδεις παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη φλεγμονώδη απάντηση και να οδηγήσουν σε αυξημένη συγκέντρωση των δεικτών φλεγμονής.

Ειδικότερα για τις σοβαρές λοιμώξεις, με δεδομένη την υψηλή νοσηρότητα αλλά και θνητότητα, θα ήταν επιθυμητός ένας δείκτης με υψηλή ευαισθησία (θετικός δείκτης στα προσβεβλημένα άτομα) και υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (αρνητικός δείκτης αποκλείει τη λοίμωξη), κατά προτίμηση ~100%, ώστε όλα τα άτομα με σοβαρές λοιμώξεις να μπορούν να διαγνωστούν και να αντιμετωπισθούν έγκαιρα και αποτελεσματικά. Επιπλέον η υψηλή ειδικότητα (αρνητικός δείκτης σε απουσία λοίμωξης) και η καλή προγνωστική αξία (θετικός δείκτης σημαίνει σοβαρή λοίμωξη), κατά προτίμηση >85%, ελαχιστοποιούν την

αλόγιστη χρήση θεραπευτικής αγωγής και ειδικότερα, των αντιβιοτικών. Τέλος, θα ήταν ιδανικό να υπάρχουν κοινά αποδεκτά όρια θετικοποίησης του δείκτη (cut off) προκειμένου να επιτρέπεται συγκριτική αξιολόγηση.^{3,4}

Ως σήμερα αναζητείται ο ιδανικός δείκτης φλεγμονής αν και αρκετές μελέτες έχουν αφιερωθεί στην έρευνα και αξιολόγηση τέτοιων βιολογικών δεικτών οι οποίοι, αν και μη ιδανικοί, θα μπορούσαν να προσφέρουν βοήθεια στο επίπεδο της κλινικής πράξης.³⁻¹⁸

Αρκετοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της φλεγμονής των αεραγωγών στα παιδιά. Στα πλαίσια αυτά κινείται η εξέταση των προκλητών πτυέλων και η μέτρησης του εκπνεόμενου ΝΟ στα παιδιά με αναπνευστικά προβλήματα. Η ανάλυση του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) και η ιστολογική εξέταση της βρογχικής βιοψίας αποτελούν συνήθεις πρακτικές σε τρίτοβάθμια κέντρα. Ωστόσο λόγω των προφανών πρακτικών δυσκολιών, αναζητήθηκαν και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη δείκτες φλεγμονής στο αίμα και/ή τα ούρα που έχουν ικανοποιητική κλινική και προγνωστική αξία.³⁻⁵

Περισσότερο χρησιμοποιούνται οι δείκτες φλεγμονής στο αίμα διότι υπάρχουν περισσότερο τυποποιημένες μέθοδοι μέτρησης και αξιολόγησης τους και ο κλινικός γιατρός είναι περισσότερο εξοικειωμένος με την εκτίμηση των δεικτών στον ορό από ότι στα ούρα ή τα άλλα βιολογικά υγρά.

Όταν υπάρχει φλεγμονή των αεραγωγών στα παιδιά τροποποιούνται οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί του αίματος με υπεροχή κατ' εξοχήν των πολυμορφοπυρήνων. Επιπλέον μεταβάλλεται η εκκριτική δραστηριότητα των κυττάρων του αίματος και αυτό αντανακλάται στην πληθώρα των φλεγμονωδών μεσολαβητών. Στη συνέχεια περιγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται στους συνήθεις ειδικούς και μη ειδικούς δείκτες στον ορό, όπως είναι η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ), η προκαλσιτονίνη και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης.^{3,4,10,12,13,16}

ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα (ΟΠ) συμμετέχουν στις οξείες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και σχετίζονται με τη διάρκεια και τη βαρύτητα της φλεγμονής και της βρογχικής υπεραπαντητικότητας στα νοσήματα του αναπνευστικού. Πρόκειται για κύτταρα που κυρίως κυκλοφορούν στο αίμα, με μέση διάρκεια ζωής 6-8 ώρες που μπορεί να παρατείνεται παρουσία ορισμένων μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως TNF-α και GMCSF. Κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους διεργασίας τα ΟΠ μετακινούνται προς τους πάσχοντες ιστούς, με την επίδραση χημειοκινών μεταξύ των οποίων η πιο ειδική είναι η IL-8. Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να εκκρίνουν με τη σειρά τους άλλους μεσολαβητές που ενισχύουν τον κύκλο της φλεγμονής: πρωτεάσες (ελαστάση, γελατινάση Β, κολλαγενάση), βακτηριοκτόνες πρωτεΐνες (λυσοζύμη, μυελοϋπεροξειδάση), οξειδωτικές ρίζες (λευκοτριένια, κυτταροκίνες όπως IL-6, IL-1, TGF-β, TNF-α, IL-8).^{2,4,12,13,15}

Υπάρχει διχογνωμία στο κατά πόσο η αύξηση των ΟΠ στο περιφερικό αίμα, αποτελεί δείκτη βαρύτητας της φλεγμονής ειδικότερα στα νοσήματα του αναπνευστικού στα βρέφη και τα παιδιά. Ειδικότερα στις βακτηριδιακές λοιμώξεις του αναπνευστικού παρατηρείται τυπικά αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων και των ΟΠ, σε αντίθεση με τις ιογενείς λοιμώξεις. Παρά ταύτα, παρατηρείται μεγάλο εύρος διασποράς των τιμών των λευκοκυττάρων στις λοιμώξεις του αναπνευστικού, ανεξάρτητα από την αιτιολογία τους. Η διασπορά αυτή καθιστά αμφίβολη την σημαντικότητα του ευρήματος της αύξησης του απόλυτου αριθμού

λευκοκυττάρων, ως δείκτη βαρύτητας ή αιτιολογίας της λοίμωξης. Αντίθετα, η αξιολόγηση της αύξησης του αριθμού των ΟΠ, με λίγες εξαιρέσεις (π.χ. λοίμωξη από αδενοϊό) συνηγορεί υπέρ βακτηριακής λοίμωξης, όπως φαίνεται από αρκετές μελέτες και πλεονεκτεί ως δείκτης βαρύτητας της φλεγμονής (Πίνακας 1).¹³

Σε παιδιά με άσθμα υπάρχει συσχέτιση της αύξησης των ΟΠ στο περιφερικό αίμα με την αύξηση των ΟΠ στο BAL αλλά αυτή δεν είναι πάντοτε γραμμική. Σε βρέφη με επίμονο συριγμό παρατηρείται γενικά αύξηση όλων των φλεγμονωδών κυττάρων στο BAL, και ειδικότερα των ΟΠ. Ωστόσο, το ποσοστό των ΟΠ, κυμαίνεται από 3-87%, ανάλογα με τη βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων, χωρίς αυτό να αντιστοιχεί σε ανάλογα ποσοστά αύξησης τους στο περιφερικό αίμα. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες φαίνεται ότι η αύξηση των ΟΠ στο περιφερικό αίμα αλλά και τους βρόγχους ακολουθεί την αύξηση της IL-8 που αποτελεί τον πιο ειδικό και ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα κύτταρα αυτά, στον τόπο της φλεγμονής. Η κινητοποίηση των ΟΠ στα νοσήματα του αναπνευστικού στα παιδιά κατ' άλλους αποδίδεται σε πιθανό βακτηριακό αποικισμό των βρόγχων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και κατ' άλλους στην αθρόα εισροή κυττάρων φλεγμονής που μπορεί να προκαλούν ποικίλες ιογενείς λοιμώξεις ή άλλοι μη βακτηριακοί αντιγονικοί παράγοντες. Ωστόσο η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις διάφορες συγκριτικές μελέτες δείχνει ότι η αύξηση των ΟΠ φαίνεται να αποτελεί μέρος της παθοφυσιολογίας της φλεγμονώδους διεργασίας, χωρίς να μπορεί από μόνη της να εξηγήσει πλήρως την παραμονή και επιμονή συμπτωμάτων σε ορισμένα παιδιά όπου παρά την έντονη κλινική συμπτωματολογία από το αναπνευστικό σύστημα τα ΟΠ δεν αυξάνονται.⁹⁻¹²

Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα είναι κύτταρα που βρίσκονται κυρίως στους διάφορους ιστούς και η παραγωγή τους από το μυελό των οστών ρυθμίζεται από την IL-3, IL-5 και τον GM-CSF. Η

Πίνακας 1. Συγκριτική αξιολόγηση αριθμού λευκοκυττάρων και πολυμορφοπυρήνων σε βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις.

Μελέτη	Αριθμός ασθενών		Βακτηριακή λοίμωξη	Ιογενής λοίμωξη
Turner et al. (1987)	98	Λευκά	16,9 ± 7,8	13,7 ± 7,7
		ΟΠ	58,0%*	47,0%
Club de pneumopediatrie (1994)	121	Λευκά	26,6 ± 8,3	13,2 ± 7,8
		ΟΠ	21,6 ± 7,9*	7,9 ± 7,7
Gendrel et al. (1996)	104	ΟΠ	14,2 *	6,1
Nohynek et al. (1995)	121	Λευκά	13,2	13,6
Korpi et al. (1997)	69	Λευκά	16,2 ± 8,1	12,3 ± 8,1
		ΟΠ	13,4 ± 7,3*	7,0 ± 59,0

* $p < 0,05$. Λευκά: απόλυτος αριθμός λευκοκυττάρων στο αίμα σε g/L, ΟΠ: απόλυτος αριθμός ή ποσοστό (%) ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων στο αίμα. Αποτελέσματα σε μέσες τιμές (± 1 σταθερή απόκλιση).

ωρίμανσή τους εξαρτάται από τη δράση της IL-5 που ρυθμίζει επίσης και τη διάρκεια ζωής τους. Τα ηωσινόφιλα περιέχουν δυνητικά κυτταροτοξικές πρωτεΐνες: μείζονα δεσμευτική πρωτεΐνη (MBP), ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (ECP), ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (EPO), ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) και απελευθερώνουν πληθώρα λιπιδιακών μεσολαβητών όπως τα λευκοτριένια LTC₄, LTD₄, LTE₄ και τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Θεωρούνται κύτταρα που τυπικά χαρακτηρίζουν το άσθμα και άλλα αλλεργικά νοσήματα και χωρίς αυτό να είναι απόλυτο, σχετίζονται τυπικά με τη βαρύτητα των ατοπικών συμπτωμάτων. Συντηρούν τη βρογχική υπεραπαντητικότητα, αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα στους βρόγχους και τραυματίζουν το βρογχικό επιθήλιο. Συμμετέχουν επίσης στον καταρράκτη της φλεγμονής με την παραγωγή σωρείας κυτταροκινών (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-16, GM-CSF, INF-γ), χημειοκινών (IL-8, RANTES, MIP-1) αλλά και αυξητικών παραγόντων (TGF-β, μεταλλοπρωτεάσες) συμβάλλοντας έτσι στην «αναδιαμόρφωση» (remodeling) των αεραγωγών.^{2,7,11,12}

Ωστόσο αν και είναι γνωστό για περισσότερο από 100 χρόνια ότι η αύξηση των ηωσινοφίλων σχετίζεται με το άσθμα αλλά και τις παρασιτικές λοιμώξεις, μόλις τα τελευταία 30 χρόνια έχει αναγνωριστεί ο ρόλος τους στην φλεγμονή. Αρχικά μελετήθηκε η δράση της MBP 2 και στη συνέχεια περιγράφηκε η ECP. Η ηωσινοφιλική πρωτεΐνη-X (EPX) και η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) περιγράφηκαν ανεξάρτητα αλλά πρόκειται για την ίδια πρωτεΐνη που για το λόγο αυτό έχει δύο διαφορετικά ονόματα. Σημαντική και τοξική για το αναπνευστικό επιθήλιο ηωσινοφιλική πρωτεΐνη είναι η EPO (ηωσινοφιλική υπεροξειδάση).^{6,17}

Τόσο η MBP όσο και η ECP προκαλούν βλάβες στο αναπνευστικό επιθήλιο. Η πρωτεΐνη EPX (ή EDN) έχει νευροτοξικές ιδιότητες αντίστοιχες της ECP, χωρίς να φαίνεται να προκαλεί επιπρόσθετες βλάβες στο αναπνευστικό επιθήλιο. Η ECP έχει αξιολογηθεί περισσότερο ως δείκτης φλεγμονής. Πρόκειται για πρωτεΐνη με ισχυρά θετικό φορτίο που χρησιμοποιείται ως δείκτης ηωσινοφιλικής δραστηριότητας. Τα τελευταία χρόνια διαπιστώθηκε ότι ECP περιέχουν επίσης τα ΟΠ και μπορούν να παράγουν άλλες ηωσινοφιλικές πρωτεΐνες, κάτι που μπορεί εν μέρει να δικαιολογηθεί από την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν και να εκκρίνουν την κυκλοφορούσα ECP. Έχει βρεθεί ότι ενώ συγκέντρωση ηωσινοφίλων στο αίμα >4% αυξάνει κατά 1,9 την πιθανότητα εύρεσης αυξημένων ηωσινοφίλων στο BAL, συγκέντρωση ECP >13μg/L αυξάνει την πιθανότητα κατά 4,4.^{18,19}

Αν και η αύξηση της ECP αντανάκλα τη φλεγμονή των αεραγωγών, όπως φαίνεται από την αντίστοιχα υψηλή συγκέντρωση των ηωσινοφίλων στο BAL ασθματικών παιδιών, η EPO φαίνεται να είναι πιο ειδική ως δείκτης αλλεργικής φλεγμονής των αεραγωγών. Στα παιδιά με άσθμα διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της βρογχικής υπεραπαντητικότητας συσχετίζεται με την αύξηση της ECP και της EPO στον ορό, αλλά αυξημένα επίπεδα ολικής IgE αντανάκλουν αύξηση μόνο της EPO. Οι Boner και συν.²⁰ κατέδειξαν ότι τα επίπεδα της ECP και της EDN αυξάνονται όταν τα παιδιά με άσθμα εκτίθενται σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αλλεργιογόνων που είναι ευαισθητοποιημένα και μειώνονται σε περιβάλλον ελεύθερο αλλεργιογόνων. Οι μεταβολές των τιμών των ηωσινοφιλικών πρωτεϊνών δεν σχετίζονται με μεταβολές του FEV₁ ούτε της PC₂₀ στη δοκιμασία ισταμίνης.

Αν και η ECP τυπικά αυξάνεται στο ατοπικό άσθμα, η επικάλυψη των τιμών ανάμεσα σε υγιείς, πάσχοντες συμπτωματικούς και μη, είναι τέτοια που καθιστά δύσκολη την πρακτική αξιολόγηση των τιμών στον ορό. Επιπλέον η αύξηση αυτή δεν αποτελεί παθογνωμονικό στοιχείο αναπνευστικής φλεγμονής καθόσον αντανάκλα συχνά έξαρση ατοπικών εκδηλώσεων από άλλα συστήματα (π.χ. ατοπική δερματίτιδα). Τέλος, η τιμή της ECP επηρεάζεται θετικά από το κάπνισμα της μητέρας ενώ μειώνεται προέλευσης της ηλικίας στα νήπια, μετά

από χορήγηση κορτικοστεροειδών και λιγότερο μετά από χορήγηση αντιλευκοτριενίων. Στα μεγαλύτερα παιδιά, δεν έχει διαπιστωθεί μείωση των τιμών ECP με την αύξηση της ηλικίας. Ωστόσο, οι παράγοντες αυτοί περιορίζουν την κλινική χρησιμότητά της και δυσχεραίνουν την ερμηνεία των ευρημάτων.³

Φαίνεται λοιπόν ότι αν και τα ηωσινόφιλα και τα παράγωγά τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή των αναπνευστικών οδών και ειδικότερα στην αλλεργία, ο ρόλος τους δεν είναι απόλυτα σαφής. Ειδικότερα για τα παιδιά με άσθμα είναι γνωστό, σε αντίθεση με τους ενήλικους, ότι κυρίαρχο ρόλο κατέχουν τα ουδετερόφιλα κύτταρα και τα παράγωγά τους στη φλεγμονή των αεραγωγών, ενώ τα ηωσινόφιλα και τα μαστοκύτταρα έχουν αναλογικά δευτερεύοντα ρόλο. Επιπλέον στην δεκαετία του 1990 ρόλος των ηωσινόφιλων στη φλεγμονή των αεραγωγών φαίνεται ότι υπερτιμήθηκε, καθόσον η αναχαίτιση της στρατολόγησης τους στους φλεγμαίνοντες αεραγωγούς, που επιτεύχθηκε με τη χρήση αντικυτταροκινών, όπως η αντι-IL-5, δεν φάνηκε να μειώνει τη υποκείμενη βρογχική υπεραπαντητικότητα ούτε να επηρεάζει σημαντικά την έκβαση της αναπνευστικής νόσου.^{3,6-9}

T- λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα T θεωρούνται ως τα κύτταρα-ενορχηστρωτές της φλεγμονώδους διεργασίας στο αναπνευστικό σύστημα. Διεγείρονται μετά την αντιγονοπαρουσίαση αντιγόνων ή αλλεργιογόνων από τα μακροφάγα ή τα δενδριτικά κύτταρα και είναι δυναμικά ικανά να αποκτήσουν διαφορετικούς κατά περίπτωση φαινότυπους και να εκκρίνουν πληθώρα φλεγμονωδών μεσολαβητών (κυτταροκίνες, χημειοκίνες). Τα λεμφοκύτταρα CD4+, κλασικά και κατ' απλούστευση, ταξινομούνται σε Th1 λεμφοκύτταρα, που παράγουν επιλεκτικά IL-2 και INF-γ, και σε Th2 λεμφοκύτταρα που παράγουν κυρίως IL-4, IL-5, IL-6 και IL-10, ευοδώνοντας την αλλεργική διεργασία. Ορισμένες κυτταροκίνες (IL-3, GM-CSF, TNF) παράγονται και από τους δύο τύπους T λεμφοκυττάρων.

Ως λεμφοκυττάρωση θεωρείται η αύξηση του απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων $>7,0 \times 10^9/L$ στα παιδιά και $>4,0 \times 10^9/L$ στους ενήλικους, ενώ σχετική λεμφοκυττάρωση θεωρείται η αύξηση του ποσοστού των λεμφοκυττάρων $>70\%$ στα παιδιά και $>45\%$ στους ενήλικους. Τυπικά παρατηρείται κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, αλλά δεν θα πρέπει να παραβλέπεται η πιθανότητα σημαντικής αύξησης του αριθμού των λεμφοκυττάρων και σε άλλα νοσήματα που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα, όπως ο κοκκύτης αλλά και οι κακοήθειες του αίματος.

Στα βρέφη και τα μικρότερα παιδιά με άσθμα παρατηρείται συνήθως αύξηση του λόγου CD4/CD8 T-λεμφοκυττάρων στο BAL. Η αύξηση είναι μεγαλύτερη στα μικρότερα βρέφη και τα νεογνά όπου είναι μικρότερος ο αριθμός των CD8. Σε ορισμένες επίσης μελέτες διαπιστώθηκε στο περιφερικό αίμα αύξηση του αριθμού των CD4 λεμφοκυττάρων, μετά από οξεία βρογχιολίτιδα, χωρίς μεταβολή των CD8.² Σε άλλες παρατηρήθηκε αύξηση των CD8 χωρίς μεταβολή του λόγου CD4/CD8. Τα αποτελέσματα αυτά δυσχεραίνουν την ερμηνεία του ρόλου των ιογενών λοιμώξεων στην επιμονή των συμπτωμάτων ασθματικού τύπου στα βρέφη και τα παιδιά προσχολικής ηλικίας. Στα ίδια παιδιά παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της INF-γ στις βρογχικές εκπλύσεις και το αίμα. Στα μικρότερα βρέφη και νεογνά διαπιστώθηκε επίσης συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση της INF-γ και του sICAM-1, κάτι που υποδηλώνει ότι η INF-γ έχει πιθανά ένα ρόλο που ευοδώνει την συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων σε περίπτωση εξελισσόμενης φλεγμονής των αεραγωγών. Η INF-γ αυξάνεται χαρακτηριστικά στο μεταβρογχιολιτιδικό σύνδρομο αλλά δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε

επίσης να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης επέκτασης της φλεγμονής στους κατώτερους αεραγωγούς. Όσο αφορά στην αύξηση του sICAM-1 σε βρέφη με άσθμα φαίνεται ότι σχετίζεται με τη βαρύτητα του άσθματος και βαίνει παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στη βαρύτητα της φλεγμονής στο άσθμα.^{1,2,4,7,9,15}

Μαστοκύτταρα, βασεόφιλα, μακροφάγα

Τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα κύτταρα θεωρούνται κύτταρα που συμμετέχουν στη χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι μαστοκυττάρων που εκκρίνουν τρυπτάση και χυμάση αντίστοιχα. Η τρυπτάση είναι πρωτεάση που διαβρώνει το βρογχικό επιθήλιο, απελευθερώνει IL-8 και ευοδώνει την έκφραση s ICAM-1 από τα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων. Επίσης διεγείρει την υπερπλασία των ινοβλαστών και των μυϊκών ινών των βρόγχων, διευκολύνει την προσέλευση των λευκοκυττάρων στον τόπο της φλεγμονής, την σύσπαση των μυϊκών ινών και την αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων. Η χυμάση αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα στο βρογχικό επιθήλιο και διεγείρει την έκκριση βλέννας.

Τα μαστοκύτταρα εκκρίνουν πλήθος προσηματισμένων μεσολαβητών, όπως ισταμίνη, ή νέο-παραγομένων, όπως λευκοτριένια και προσταγλανδίνες, κυρίως PGD₂. Τέλος, συμμετέχουν στην παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών ευοδωτικών της φλεγμονής (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GMCSF, INF- γ , TNF- α).^{1,2,7,9}

Όσον αφορά στα βασεόφιλα, ως σήμερα δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες για το ρόλο τους στη φλεγμονή των αεραγωγών. Οι Ennis και συν.²¹ προκειμένου να εκτιμήσουν το ρόλο των μαστοκυττάρων, μέτρησαν τις συγκεντρώσεις της ισταμίνης και της τρυπτάσης στο BAL σε μικρά παιδιά με άσθμα και σε παιδιά χωρίς άσθμα. Οι τιμές βρέθηκαν αυξημένες και στις δύο ομάδες μελέτης, χωρίς σημαντικές διαφορές, που συνηγορεί για τον αμφίβολο ρόλο των μαστοκυττάρων στην παθογένεια του άσθματος στο μικρό παιδί. Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν από την μέτρηση της τρυπτάσης στο αίμα σε παιδιά με άσθμα και υγιείς μάρτυρες.^{1,2,4,7,9,15}

Τα μακροφάγα είναι μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα (μονοκύτταρα) ή βρίσκονται στους ιστούς (π.χ. κυψελιδικά μακροφάγα). Είναι τα κύτταρα που παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα T-λεμφοκύτταρα τα οποία με τη σειρά τους διεγείρουν περαιτέρω τα μακροφάγα με τη μεσολάβηση της INF- γ . Εκτός από τη γνωστή φαγοκυτταρική τους ικανότητα τα μακροφάγα εκκρίνουν μεσολαβητές που ευοδώνουν τη φλεγμονή (IL-1, TNF- α , GMCSF, IL-6), αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-10), λιπιδικούς μεσολαβητές (λευκοτριένια, PAF), χημειοκίνες (IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2) και αυξητικούς παράγοντες (TGF- β). Θεωρούνται τα «ώριμα» κύτταρα στον καταρράκτη της φλεγμονής και έχουν διαφορετική λειτουργία και φαινότυπο σε παιδιά με φλεγμονή του αναπνευστικού επιθηλίου και ειδικότερα σε παιδιά με άσθμα.^{2,7}

TACHYTHTA KATHIZHSHS EPYΘPΩN, ΠPOKAΛCITONINH, ΠPOTEΪNES OΞEIAS ΦACHΣ

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής συστηματικής ή τοπικής στο αναπνευστικό σύστημα, αυξάνεται η ΤΚΕ ενώ παρατηρείται λευκοκυττάρωση με στροφή του τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων προς τα αριστερά. Ως σήμερα στην καθημερινή πρακτική του παιδιατρου τα ευρήματα αυτά έχουν διαγνωστική αξία όσον αφορά στην βαρύτητα και την αιτιολογία μιας φλεγμονής. Ωστόσο η κατανόηση του μηχανισμού της φλεγμονής επιτρέπει την αξιολόγηση

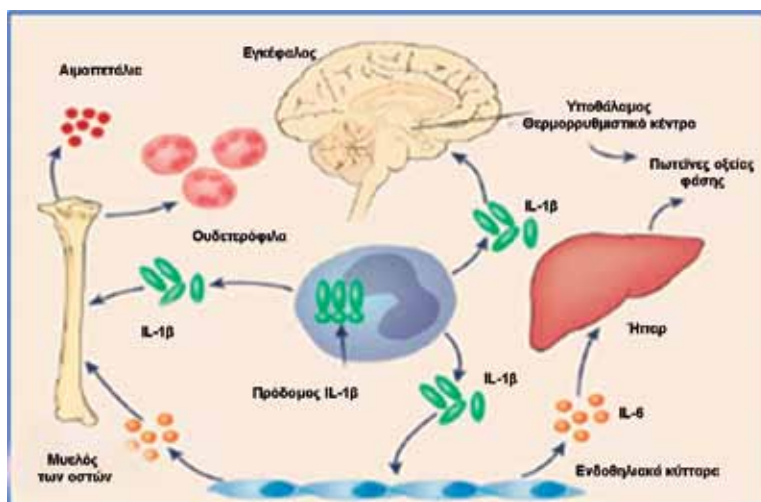
της μεταβολής αυτών των δεικτών. Εξ αιτίας των παραγόμενων κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα και τα κυψελιδικά μακροφάγα κατά την έναρξη της φλεγμονώδους διεργασίας, τα περισσότερα από τα περιφερικά όργανα τροποποιούν την ισορροπία των παραγομένων από αυτά πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την εκδήλωση πυρετού, λευκοκυττάρωσης και κυρίως την παραγωγή πρωτεϊνών «οξείας φάσης» από το ήπαρ (Εικόνα 1).^{1-3,7,15}

Η αύξηση της παραγωγής των πρωτεϊνών οξείας φάσης αποτελεί μια από τις μείζονες αντιδράσεις ενεργοποίησης του ενδογενούς αμυντικού συστήματος. Παράγεται πληθώρα πρωτεϊνών μέσα σε λίγες ώρες, που μπορεί, στις σοβαρότερες περιπτώσεις, να είναι αυξημένες έως και 1000 φορές περισσότερο από τις βασικές τιμές τους στον ορό. Χαρακτηριστικά αυξάνονται η προκαλσιτονίνη, η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), και το αμυλοειδές Α του ορού (SAA). Η πτώση ιδιαίτερα των δύο τελευταίων με την υποχώρηση της φλεγμονής είναι ταχύτατη και συνηγορεί για την ύφεση της φλεγμονής και την καλή θεραπευτική ανταπόκριση.^{14,15}

Άλλες πρωτεΐνες, όπως το συμπλήρωμα, η αποσφαιρίνη ή το ινωδογόνο αυξάνονται 2-5 φορές περισσότερο από τις φυσιολογικές τιμές τους στον ορό μετά την έναρξη της φλεγμονής. Όμως η μέγιστη τιμή τους έρχεται αργότερα σε σχέση με τις προηγούμενες. Αντίθετα, για άλλες πρωτεΐνες παρατηρείται πτώση των φυσιολογικών τιμών έως και 25% κατά τη διάρκεια φλεγμονής (προ-αλβουμίνη, αλβουμίνη, τρανσφερίνη, απολιποπρωτεΐνη Α1, α1-αντιθρυψίνη).^{7,9,13,18,22}

Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων

Το 1921 εφαρμόστηκε για πρώτη φορά η πιο ικανοποιητική μέθοδος για τη μέτρηση της ΤΚΕ, η μέθοδος Westergren. Έκτοτε, αν και υπήρξε εκτεταμένος βιβλιογραφικός διάλογος πάνω στο θέμα, η μέτρηση της ΤΚΕ παραμένει πολύ χρήσιμη εργαστηριακή εξέταση χωρίς όμως ειδική αξία. Η τιμή της ΤΚΕ την πρώτη ώρα, εξαρτάται κυρίως από την συγκέντρωση παραγόντων φλεγμονής, όπως ανοσοσφαιρινών και ινωδογόνου στο αίμα. Αυξάνεται



Εικόνα 1. Η διαδικασία της φλεγμονής και η παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ.

κατά τη διάρκεια λοίμωξης ή οποιασδήποτε σοβαρής φλεγμονής και είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση συστηματικών ανοσολογικών νοσημάτων και λοιμώξεων. Σε σχέση με την CRP παρουσιάζει το πλεονέκτημα του χαμηλότερου κόστους, της σχετικής εμπειρίας των κλινικών και εργαστηριακών γιατρών όσον αφορά στην αξιολόγησή της και της γνώσης των παραγόντων που την τροποποιούν. Όμως, παρά το ότι είναι εύκολη στη μέτρηση και στην ποσοτική αξιολόγησή της δεν αποτελεί ειδική εξέταση και ειδικότερα στα νοσήματα της παιδικής ηλικίας δεν παρέχει ακριβείς πληροφορίες σχετικά με την έκβαση μιας φλεγμονής. Στα παιδιά και στους ενήλικους >65 ετών, η φυσιολογική ΤΚΕ την πρώτη ώρα είναι <30 mm. Στους άνδρες κατά μέσο όρο < (ηλικία /2) και στις γυναίκες <(ηλικία + 10)/2.

Σε ορισμένες αιμοσφαιρινοπάθειες όπου παρατηρείται δυσμορφία των ερυθρών αιμοσφαιρίων (μικρότερο ή ανώμαλο σχήμα) παρατηρείται βραδύτερη καθίζηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επίσης σε ασθενείς με πολυκυτταραιμία, ή υπερβολική αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων (π.χ. λευχαιμία) μπορεί να παρατηρείται παρεμπόδιση της καθίζησης των ερυθρών και κατά συνέπεια η ΤΚΕ μπορεί να παραμένει χαμηλή. Για τον ίδιο λόγο σε δυσπρωτεϊναιμίες (υπογαμμασφαιριναιμία, υποϊνωδωγοναιμία) και σύνδρομο υπεργλοιοτότητας η ΤΚΕ μπορεί να παραμένει χαμηλή. Οι περιπτώσεις αυτές πρέπει να συνεκτιμώνται όταν οι ασθενείς εμφανίζουν συνοδά αναπνευστικά συμπτώματα, για τα οποία πρέπει να ληφθούν θεραπευτικές αποφάσεις.

Ο συνδυασμός της ταυτόχρονης αξιολόγησης χαμηλής ΤΚΕ και CRP έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί έχει πολύ καλή αρνητική προγνωστική αξία και αποκλείει σε υψηλό ποσοστό την πιθανότητα σοβαρής φλεγμονής.^{7,10}

Προκαλσιτονίνη

Η προκαλσιτονίνη (PCT) είναι η πρόδρομος μορφή της ορμόνης καλσιτονίνης. Αν και παράγεται κυρίως από τα C κύτταρα του θυροειδούς αδένος, φαίνεται ότι μπορεί να παραχθεί και από άλλα όργανα ή κύτταρα του οργανισμού, κατά τη διάρκεια φλεγμονής και κυρίως ως απάντηση σε βακτηριακή λοίμωξη. Έχει όμως αποδειχθεί, ότι σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεΐνες οξείας φάσης, δεν παράγεται ούτε απεκκρίνεται από το ήπαρ.

Πρόκειται για ειδική πρωτεΐνη (πολυπεπτίδιο, MB 12,6 kDa) που αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο σύνδρομο φλεγμονής βακτηριακής αιτιολογίας. Σε αντίθεση με άλλους δείκτες φλεγμονής (ΤΚΕ, CRP, SAA, κυτταροκίνες ευδοτωτικές της φλεγμονής) η PCT αυξάνεται μεν στις βακτηριακές, παρασιτικές και μυκητιασικές λοιμώξεις, αλλά παραμένει φυσιολογική σε ιογενείς λοιμώξεις καθώς και σε φλεγμονές μη λοιμώδους αιτιολογίας. Χρησιμοποιείται ως βιολογικός δείκτης κυρίως για τον καθορισμό της βαρύτητας μιας λοίμωξης και ειδικότερα στην παρακολούθηση σηπτικών καταστάσεων, αλλά και σε περιπτώσεις διερεύνησης παρατενόμενου πυρετού άγνωστης αιτιολογίας όπου οι χαμηλές τιμές αποκλείουν σχεδόν το ενδεχόμενο βακτηριακής λοίμωξης. Παρότι δεν είναι ακόμη ευρέως αποδεκτή στην κλινική πράξη φαίνεται να κερδίζει έδαφος στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας κυρίως, όπου χρησιμοποιείται για τη σταδιοποίηση της σηψαιμίας.

Αυξάνεται ταχύτητα μετά την είσοδο ενδοτοξινών στον οργανισμό (3 ώρες) και φτάνει τις μέγιστες τιμές της 6-12 ώρες αργότερα. Η παραγωγή της συμβαδίζει χρονικά με την αύξηση των κυταροκινών που ευδοτώνουν τη φλεγμονή (IL-6, TNF-α). Πλεονέκτημα επίσης της PCT είναι η ταχεία αποδόμησή της (έως και 50% μέσα σε 24 ώρες) μετά της λύση της φλεγμονής.²⁵

Σε παιδιά με σοβαρή πνευμονία φαίνεται ότι η PCT μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για την χορήγηση και τη διάρκεια χορήγησης αντιβιοτικών. Αν και υπάρχουν αναδρομικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι η PCT έχει μάλλον περιορισμένη θετική προγνωστική αξία,

αρκετοί θεωρούν ότι λόγω της υψηλής, σχετικά με τη CRP, ειδικότητας και ευαισθησίας (~90%) η ανεύρεση τιμών PCT $\geq 0,25$ microg/L δικαιολογεί τη χρήση αντιβιοτικών και την παράταση της θεραπείας.^{1,4,7,13,18,22,23}

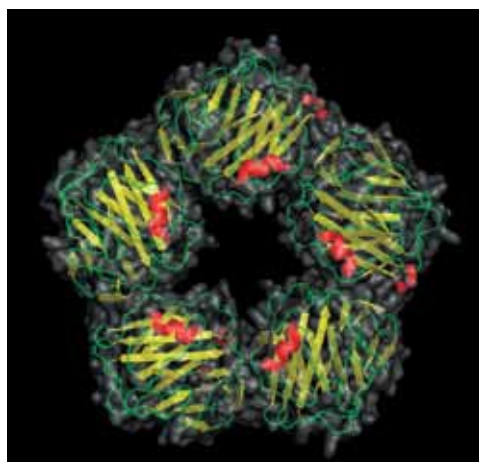
C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)

Η CRP είναι πρωτεΐνη 25 kDa που ανακαλύφθηκε το 1930 σε ορό ασθενών με οξεία φλεγμονή. Το υπεύθυνο γονίδιο για τη σύνθεση της CRP βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 1 (1q21-1q23). Παρατηρείται μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου αυτού, κάτι που εν μέρει ερμηνεύει τη μεγάλη ποικιλία αποκλίσεων από τις φυσιολογικές τιμές σε διαφορετικά άτομα. Η CRP αντιδρά με τον πολυσακχαρίτη C του πνευμονιόκοκκου και για το λόγο αυτό ονομάστηκε C πρωτεΐνη.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, η πρωτεΐνη C είναι πενταξίνη καθώς έχει το σχήμα ενός δακτυλιοειδούς πενταμερούς δίσκου. Κάθε μια από τις 5 υπομονάδες του δακτυλίου φέρει 206 αμινοξέα. Είναι η πιο γνωστή από τις πρωτεΐνες οξείας φάσης που αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους διεργασίας. Η αύξηση οφείλεται στην παραγωγή από τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά και τα T- λεμφοκύτταρα, IL-6 και IL-1 β (Εικόνα 1). Η CRP κυρίως διεγείρει την κλασσική οδό του συμπληρώματος, κινητοποιεί τα λευκοκύτταρα, διεγείρει τη φαγοκυττάρωση και μπορεί να καθηλώσει ανοσοσφαιρίνες IgG.^{17,23}

Η CRP αυξάνεται γρήγορα κατά την έναρξη της φλεγμονής. Μέσα σε 6-8 ώρες από την έναρξη της φλεγμονής η CRP παρουσιάζει ήδη αύξηση για να φτάσει στη μέγιστη τιμή της σε 72 ώρες περίπου (έως και 1000 φορές πάνω από τη βασική της τιμή) (φυσιολογικές τιμές <0,25 mg/dL ή <2,5 mg/L). Επιπλέον παρουσιάζει μικρό χρόνο ημιζωής (μέσος χρόνος ημιζωής 12-18 ώρες) και επιστρέφει στις αρχικές τιμές της μετά μια εβδομάδα, εφόσον αρθεί το αίτιο και αναχαιτισθεί η εξέλιξη της φλεγμονής. Τέλος, δεν επηρεάζεται, όπως η ΤΚΕ, από την παρουσία αναιμίας, το φύλο, την ηλικία ή το σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι ιδιότητες αυτές της προσδίδουν ιδιαίτερη σημασία για την παρακολούθηση της έκβασης και της θεραπείας οξέων παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι οι λοιμώξεις του αναπνευστικού στα παιδιά.

Η πρωτεΐνη αυτή σε συνθήκες φλεγμονής αποβάλλει 1-2 αμινοξέα από τον δακτύλιό της



Εικόνα 2. Η πρωτεΐνη CRP.

και στις κενές θέσεις που προκύπτουν μπορεί να συνδεθεί με σάκχαρα και να γλυκοζυλιωθεί. Η ικανότητά της να γλυκοζυλιώνεται προσδίδει ιδιαίτερη σημασία καθώς σε διαφορετικά φλεγμονώδη νοσήματα παρατηρείται σύνδεση διαφορετικών σακχάρων σε διαφορετικές θέσεις του δακτυλίου της. Το πρότυπο σύνδεσης (pattern) είναι διαφορετικό σε διαφορετικά νοσήματα αλλά το ίδιο σε διαφορετικούς ασθενείς με το ίδιο νόσημα και σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις θα μπορούσε να χρησιμεύσει στη διαφοροποίηση λοιμωδών και μη φλεγμονωδών νοσημάτων.¹³

Σε αντίθεση με την ΤΚΕ δεν υπάρχουν ως σήμερα φλεγμονώδεις καταστάσεις που μπορεί να συνδέονται με μειωμένη CRP. Τη

μοναδική εξαίρεση αποτελούν ασθενείς με φλεγμονή και σοβαρή ηπατική ανεπάρκεια, όπου λόγω αδυναμίας σύνθεσής της η CRP παραμένει χαμηλή. Η CRP γενικά αυξάνεται σε όλα τα λοιμώδη και συστηματικά νοσήματα του αναπνευστικού καθώς και των άλλων συστημάτων, σε όλα τα κακοήθη νοσήματα, σε περιπτώσεις ισχαιμικών εμφράκτων (πνευμονικό, καρδιακό) καθώς και σε τραυματισμούς και εγκαύματα του θώρακα. Η CRP σε αντίθεση με την ΤΚΕ αυξάνεται ελάχιστα τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων και ορισμένων νοσημάτων του συνδετικού ιστού, όπως ο ερυθριματώδης λύκος (ΣΕΛ) και η σκληροδερμία, εφόσον αυτές οι καταστάσεις δεν επιπλέκονται με βακτηριακή λοίμωξη. Αντίθετα δεν μειώνεται με τη χρήση κορτικοειδών φαρμάκων όπως η ΤΚΕ.^{13,22}

Ειδικότερα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η αύξηση της hs CRP (high sensitivity CRP) που μετράται με μεθόδους υψηλής ευαισθησίας, φαίνεται να σχετίζεται με έξαρση των αναπνευστικών συμπτωμάτων και μείωση των λειτουργικών δοκιμασιών πνευμονικής λειτουργίας (FEV₁) σε παιδιά με άσθμα.¹⁷

Παρουσιάζει σχετικά υψηλή ευαισθησία λίγες ώρες μετά την έναρξη της φλεγμονής (82-84%) και έχει πολύ καλή ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία που κυμαίνεται σε διάφορες μελέτες από 93-100%. Συμπερασματικά η CRP μπορεί να χρησιμοποιείται κλινικά με αρκετή ασφάλεια, για τη διάγνωση και παρακολούθηση λοιμώξεων, ιδιαίτερα βακτηριακών, χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων και κακοηθειών.^{4,7,14,17,19}

Αμυλοειδές Α του ορού (SAA)

Η πρωτεΐνη SAA (ως σήμερα γνωστοί έξι διαφορετικοί ισότυποι: SAA1-6), ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών οξείας φάσης που παράγονται κυρίως από το ήπαρ κατά τη διάρκεια φλεγμονής, αλλά σε μικρότερο βαθμό και από φλεγμονώδη κύτταρα (μακροφάγα, ΟΠ). Θεωρείται πρόδρομος μορφή της πρωτεΐνης του αμυλοειδούς Α, που συσσωρεύεται στους ιστούς κατά τη δευτεροπαθή αμυλοείδωση.

Στον ορό συμπεριφέρεται ως απολιποπρωτεΐνη, βρίσκεται δηλαδή συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες και κυρίως με την HDL. Ωστόσο μόνο μικρό ποσοστό της HDL (περίπου 1%) βρίσκεται συνδεδεμένο με την SAA. Αυτό εξηγεί και την παραγνώριση της για πολύ καιρό κατά τη μελέτη των απολιποπρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη SAA αντικαθιστά την απολιποπρωτεΐνη Α-1 στις θέσεις σύνδεσης της με την HDL και φαίνεται ότι για το λόγο αυτό η αυξημένη συγκέντρωση της αυξάνει τον κίνδυνο για αγγειακά έμφρακτα κατά τη διάρκεια χρόνιων φλεγμονωδών και ρευματικών νοσημάτων.⁷

Ο ρόλος της SAA είναι αρχικά ανοσορρυθμιστικός. Φαίνεται ότι παρεμβαίνει στο μηχανισμό της αντιγονοπαρουσίασης τροποποιώντας την αναγνώριση των αντιγόνων από τους ειδικούς υποδοχείς των Τ-λεμφοκυττάρων και παρεμποδίζοντας τη συνεργασία μεταξύ Τ-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων. Επιπλέον μειώνει τη δραστικότητα των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (NK).¹⁵

Μεταξύ των λειτουργιών της SAA συμπεριλαμβάνονται ο μεταβολισμός της HDL, η μεταφορά της χοληστερόλης στο ήπαρ, η στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων στον τόπο της φλεγμονής και η επαγωγή διαφόρων ένζυμων που συμβάλλουν στην αποδόμηση του εξωκυττάρου χώρου.

Μετά την έναρξη της φλεγμονής η SAA αυξάνεται έως και 1000 φορές μέσα σε 24 ώρες. Σε χρόνιες φλεγμονές, όπου η παραγωγή της SAA παρατείνεται, ευκαιριακά αναπτύσσεται δευτεροπαθώς αμυλοειδές στους ιστούς, με αποτέλεσμα δυσμενή έκβαση της νόσου. Ωστόσο η αμυλοείδωση δεν ακολουθεί πάντα κάθε αύξηση της SAA καθώς μόνο ορισμένες από τις ισομορφές της φαίνεται να προάγουν την εναπόθεση αμυλοειδούς στους ιστούς.

Ειδικότερα η SAA αποτελεί πιο ευαίσθητο δείκτη για την παρακολούθηση οξέων ιογενών λοιμώξεων. Αν και η CRP αυξάνει σημαντικά κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων και χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση και παρακολούθηση τους, κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων παραμένει χαμηλή ή μεταβάλλεται σε πολύ στενό εύρος (συνήθως <7 mg/L) για τις συνήθεις λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού). Η SAA μεταβάλλεται σε μεγαλύτερο εύρος τιμών (έως και 10 φορές μεγαλύτερη αύξηση από την CRP, προσεγγίζοντας ~ 30-70 mg/L για τις συνήθεις λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού) και για το λόγο αυτό θεωρείται χρήσιμος κλινικά δείκτης για την παρακολούθηση οξέων ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού, όπου η CRP δεν μεταβάλλεται σημαντικά.

Οι πρωτεΐνες SAA αυξάνονται επίσης σημαντικά στον ορό ασθενών με κακοήγη νοσήματα, αυτοάνοσα νοσήματα, στη φυματίωση και γενικότερα σε όλες τις βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις, ενώ αποτελούν εξαιρετικά ευαίσθητο δείκτη για την παρακολούθηση ειδικών καταστάσεων όπως η απόρριψη μοσχευμάτων.^{7,14,15}

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το «σύνδρομο» οξείας ή χρόνιας συστηματικής ή τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης αποτελεί ένα από τα καθημερινά προβλήματα της κλινικής παιδιατρικής και ειδικότερα παιδοπνευμονολογικής πράξης. Οι κλασικοί δείκτες φλεγμονής, όπως η ΤΚΕ και ο αριθμός των λευκοκυττάρων εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται με ευχέρεια και παραμένουν χρήσιμοι στην αξιολόγηση κοινών διαγνωστικών διλημάτων. Ωστόσο η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών της φλεγμονής επέτρεψε τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση νεότερων δεικτών φλεγμονής στον ορό (φλεγμονώδη κύτταρα, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες) αλλά και των πρωτεϊνών οξείας φάσης (CRP, SAA, PCT) που συνεισφέρουν σημαντικά, μόνες ή σε συνδυασμό μεταξύ τους, στη διάγνωση και αντιμετώπιση μιας φλεγμονής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gervais A. Marquers biologiques de l' inflammation dans les centres d'urgences pidiatriques. Arch Pidiatr 2005; 12: 694-696.
2. Marguet C, Couderc L. Marquers de l'inflammation dans l'asthma du nourrisson. Arch Pidiatr. 2002; 9 (Suppl 3): s350-s356.
3. Wennegren G. Inflammatory mediators in blood and urine. Pediatr Respir Rev 2000; 1: 259-265.
4. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. Review. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2004; 89: F229-F235
5. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Suzuki Y, Zerman L., Peterson CGB et al. Exhaled nitric oxid, serum ECP and airway responsiveness in mild asthmatic children. Eur Respir J 2000; 15: 830-843.
6. Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakanson L, Karawaczyk M, Peterson C et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. Clin Exp Allergy 1999; 29: 1172-1186.
7. Fauve RM, Hevin MB, Hachulla E. Raction inflammatoire, ractions immunitaires et protines de la phase aigu. In: Françoise Russo Marie, L'Inflammation. John Libbey Eurotext Ed; 1998. p. 10-20, 468-491.
8. Koh GC, Shek LP, Goh DY, Bever Van H, Koh DS. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. Respir Med 2007; 101: 696-705.

9. Leung TF, Wong GW, Ko FW, Lam CW, Fok TF. Clinical and atopic parameters and airway inflammatory markers in childhood asthma: a factor analysis. *Thorax* 2005; 60: 822-826.
10. Chung KF. Non invasive Biomarkers of Asthma. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1999; 18: 41-44.
11. Maclellan C, Hutchinson P, Holdsworth S, Bardin PG, Freezer NJ. Airway inflammation in asymptomatic children with episodic wheeze. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 577-583.
12. Lemanske RF. Inflammation in childhood asthma and other wheezing disorders. *Pediatrics* 2002; 109: 368-372.
13. Roux Pe L. Les examens ü visie itiologique dans les pneumopathies communautaires de l' enfant (hors imagerie). *Arch Pidiatr* 1998; 5 (Suppl 1): 528-532.
14. Malcolm L, Bridgen ML. Clinical utility of the erythrocyte sedimentation rate. *Am Fam Physician* 1999; 60: 1443-1445.
15. Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M. Monitoring both serum amyloid protein A and C-Reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem* 1993; 39: 293-297.
16. Chien JY, Hsueh PR, Cheng WC, Yu CJ, Yang PC. Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome. *Respirology* 2006; 11: 715-722.
17. Soferman R, Glatstein M, Sivan Y, Weismann Y. HsCRP levels: Measurement of airway inflammation in asthmatic children. *Pediatr Int* 2008; 50: 12-16.
18. Gleigh GJ. Mechanisms of eosinophil- associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663.
19. Shields MD, Brown V, Stevenson EC, Fitch PS, Schock BC, Turner G, et al. Serum eosinophil cationic protein and blood eosinophil counts for the prediction of the presence of airway inflammation in children with wheezing. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1382-1389.
20. Boner AL, Peroni DG, Piacentini GL, Venge P. Influence of allergen avoidance at high altitude on serum markers of eosinophil activation in children with allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 1021-1026.
21. Ennis M, Turner G, Schock BC, Stevenson EC, Brown V, Fitch PS, et al. Inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage samples from children with and without asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 362-366.
22. Moulin F, Raymond J, Lorrot M, Marc E, Coste J, Iniguez J-L, et al. Procalcitonin in children admitted to hospital with community acquired pneymonia. *Arch Dis Child* 2001; 84: 332-336.
23. Hatherill M, Tibby SM, Sykes K, Turner C, Murdoch IA. Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C reactive protein and leucocyte count. *Arch Dis Child* 1999; 81: 417-421.

Αναζήτηση λοιμωδών παραγόντων στο αίμα και στα ούρα

Ι. Γριβέα, Α. Μιχούλα

Η διαγνωστική προσέγγιση των νοσημάτων του αναπνευστικού στα παιδιά στηρίζεται στην κλινική και ακτινολογική εικόνα του ασθενούς, αλλά και στον εργαστηριακό έλεγχο. Για να πιθανολογήσει κανείς τον αιτιολογικό παράγοντα λοίμωξης του αναπνευστικού, χρειάζεται το λεπτομερές ιστορικό, τη φυσική εξέταση όπως επίσης και τα επιδημιολογικά δεδομένα, χωρίς να τεκμηριώνεται και πάλι η αιτιολογία της νόσου.

Η απομόνωση ενός ή περισσότερων αιτιολογικών παραγόντων συμβάλλει στη λήψη της σωστής απόφασης, όσον αφορά στη χορήγηση ή όχι αντιμικροβιακής αγωγής, στην επιλογή του κατάλληλου φαρμάκου, αλλά και στην αναγνώριση ειδικών μικροοργανισμών που έχουν επιδημιολογικό ενδιαφέρον, όπως *Mycobacterium tuberculosis* και *Legionella pneumophila*.

Ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις που γίνονται στο αίμα και στα ούρα ασθενών με λοίμωξη του αναπνευστικού μας βοηθούν στην τεκμηρίωση του αιτίου της λοίμωξης με άλλοτε άλλη ακρίβεια και ευαισθησία (Πίνακας 1).

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Υπάρχουν περισσότερα από 100 αίτια λοιμώξεων κατώτερου αναπνευστικού, και σχεδόν όλα έχουν απομονωθεί από πνευμονικό ιστό τουλάχιστον μία φορά. Ωστόσο, επεμβατικές μέθοδοι δεν μπορούν να αποτελέσουν εξέταση ρουτίνας. Για την τεκμηρίωση του αιτιολογικού παράγοντα σε λοιμώξεις του αναπνευστικού απαιτούνται απλές εξετάσεις.

Συστάσεις από την Μεγάλη Βρετανία¹ (British Thoracic Society) και τον Καναδά² (Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society) κάνουν σαφές ότι θα πρέπει σε κάθε παιδί που νοσηλεύεται λόγω πνευμονίας να λαμβάνονται δύο δείγματα αίματος για καλλιέργεια αίματος, υπό άσηπτες συνθήκες. Τα δείγματα θα πρέπει να

Πίνακας 1. Εργαστηριακές εξετάσεις για την αναζήτηση λοιμωδών παραγόντων του αναπνευστικού στο αίμα και στα ούρα.

- **Καλλιέργεια αίματος** για την ανίχνευση μικροβίων όπως π.χ. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.
- **PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)** στο αίμα για γενετικό υλικό βακτηρίων.
- **Συγκολλητινοαντίδραση Latex στα ούρα** για ανίχνευση αντιγόνου μικροβίων όπως π.χ. *Streptococcus pneumoniae* ή *Legionella pneumophila*

λαμβάνονται, εάν είναι δυνατόν, πριν από την έναρξη της αγωγής, και ίσως αποτελούν την μοναδική ευκαιρία τεκμηρίωσης του αιτιολογικού παράγοντα.

Η ανάπτυξη στην καλλιέργεια αίματος κοινών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, β -*haemolyticus Streptococcus* group A ή B, *Klebsiella pneumoniae*, τεκμηριώνει το αίτιο της λοίμωξης. Σε ειδικές ομάδες παιδιών, όπως σε ανοσοκατεσταλμένα ή νοσηλευόμενα σε Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας, στην καλλιέργεια αίματος μπορεί να αναπτυχθούν και άλλοι, μη κοινοί λοιμογόνοι παράγοντες, όπως *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans* και άλλοι, που αξιολογούνται ανάλογα με τα κλινικά δεδομένα.

Ο παθογόνος μικροοργανισμός που αναπτύχθηκε σε καλλιέργεια αίματος, που ελήφθη υπό άσηπτες συνθήκες, θεωρείται και το αίτιο της συγκεκριμένης λοίμωξης. Η ανάπτυξη *Staphylococcus epidermidis* (κοαγκουλάση αρνητικός σταφυλόκοκκος) τις περισσότερες φορές σχετίζεται με επιμόλυνση του δείγματος.

Τα ερωτήματα που συχνά καλείται ο κλινικός γιατρός να απαντήσει, όσον αφορά στην χρησιμότητα της καλλιέργειας αίματος στις λοιμώξεις του αναπνευστικού, είναι:

1. Ποιο είναι το ποσοστό των παιδιών με πνευμονία και θετική καλλιέργεια αίματος;
2. Ποιος είναι ο μικροοργανισμός που απομονώνεται συχνότερα;

Όσον αφορά στο πρώτο ερώτημα, κάθε μεγάλη μελέτη παιδιών με πνευμονία της κοινότητας, από τις πιο παλιές έως και τις πιο πρόσφατα δημοσιευμένες, τονίζει την διαγνωστική αξία της καλλιέργειας αίματος παρά το γεγονός ότι το ποσοστό θετικής καλλιέργειας αίματος σε λοιμώξεις του αναπνευστικού είναι χαμηλότερο του 10% (Πίνακας 2).^{3,4} Το ποσοστό αυτό μπορεί να φαίνεται χαμηλό, έχει όμως μεγάλη σημασία, αν ληφθεί υπόψη ότι στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί και την πιο κοινή διαγνωστική εξέταση που διαθέτουμε για την ανεύρεση του αιτίου της λοίμωξης.

Η χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής πριν τη λήψη καλλιέργειας αίματος, ακόμη και ελάχιστων δόσεων, μειώνει σημαντικά την πιθανότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν εξακολουθεί να υπάρχει. Σε μία από τις μεγαλύτερες μελέτες για την πνευμονία της κοινότητας που περιλάμβανε όλα τα νοσηλευόμενα περιστατικά πνευμονίας σε νοσοκομεία του Οhio, για έναν χρόνο, το ποσοστό θετικής καλλιέργειας αίματος ήταν 7,4%.⁵ Το ποσοστό θετικής καλλιέργειας για πνευμονιόκοκκο σε παιδιά που δεν είχαν λάβει καμία δόση αντιβιοτικού ήταν 6,4% και μόλις 2,7% μεταξύ αυτών που είχαν λάβει κάποια αντιμικροβιακή αγωγή.

Σε μελέτη από την ομάδα του Dallas των ΗΠΑ σε 711 παιδιά με πνευμονία της κοινότητας, ηλικίας 0-15 χρονών, η καλλιέργεια αίματος ήταν θετική στα 20 από αυτά (4%).⁴ Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν ήταν *S. Pneumoniae* σε 9 παιδιά, *S. aureus* σε 5, *H. influenzae* τύπου b σε 4, και τέλος *S.pyogenes* σε 2.

Πίνακας 2. Πιθανοί λόγοι για τους οποίους το ποσοστό θετικοποίησης της καλλιέργειας αίματος είναι χαμηλό.

-
- Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των παθογόνων μικροοργανισμών
 - Οι μικροοργανισμοί δεν προκαλούν βακτηραιμία ή αυτή είναι περιορισμένη με μικρό αριθμό κυττάρων ανά ml αίματος
 - Διαλείπουσα βακτηραιμία
 - Μη επιτυχή – επαρκή δείγματα
 - Η αυτόλυση του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας
 - Η προηγηθείσα λήψη αντιμικροβιακής αγωγής.
-

Σε παιδιά με λοβώδη πνευμονία παρατηρήθηκε πως όσο αυξάνεται η σοβαρότητα της πνευμονίας, τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα για θετική καλλιέργεια αίματος.⁶ Από 77 παιδιά με λοβώδη πνευμονία αλλά χωρίς επιπλοκές, στα 6 (7,8%) η καλλιέργεια αίματος ήταν θετική (5 *S. pneumoniae*, 1 *S. aureus* ανθεκτικός στη μεθικιλίνη), ενώ από τα 54 παιδιά με λοβώδη πνευμονία και επιπλοκές (εμπύημα ή νεκρωτική πνευμονία) τα 8 (14,8%) είχαν θετική καλλιέργεια αίματος (7 *S. pneumoniae*, 1 *K. pneumoniae*).

Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί το συχνότερο κοινό μικροβιακό αίτιο πνευμονίας. Είναι ο μικροοργανισμός που απομονώνεται πιο συχνά από την καλλιέργεια αίματος σε ασθενείς με λοίμωξη του αναπνευστικού. Σε μελέτες όμως που αναφέρονται σε περιστατικά νοσηλευόμενα σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, και ιδιαίτερα εάν έχουν μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, από την καλλιέργεια αίματος μπορεί να απομονωθούν και άλλοι μικροοργανισμοί όπως *Gram* αρνητικά βακτήρια.

Λόγω της αυξημένης συχνότητας του πνευμονιοκόκκου ως αίτιο λοίμωξης του αναπνευστικού, έχουν γίνει προσπάθειες να αναζητηθεί και σε άλλα είδη δειγμάτων όπως στα πτύελα, ιδιαίτερα στους ενήλικους, ή σε υγρό από παραπνευμονική συλλογή.

Από τα όσα αναφέρθηκαν για την αξία της καλλιέργειας στην αιτιολογική τεκμηρίωση της πνευμονίας είναι σαφές πως απαιτούνται και άλλες εξετάσεις με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, αλλά και έγκαιρη αναγνώριση μικροοργανισμών. Έτσι, οι εξετάσεις με τις οποίες ανιχνεύονται αντιγόνα (Latex) ή γονιδίωμα βακτηρίων (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR) αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη λύση.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

Εκτός από την αιμοκαλλιέργεια, η PCR αίματος, είναι μέθοδος που μπορεί να αξιοποιηθεί στην προσπάθεια ανεύρεσης του αιτίου της λοίμωξης του αναπνευστικού. Με αυτήν αναγνωρίζεται γενετικό υλικό (γονιδίωμα) διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών στο αίμα. Η PCR ανακαλύφθηκε το 1983 στην Καλιφόρνια και βασίζεται στη χρησιμοποίηση εκκινητών (primers) οι οποίοι ενώνονται με νουκλεοτίδια και με μία πολυμεράση επάνω στο δείγμα-στόχο, που με συνεχείς κύκλους εναλλαγής θέρμανσης – ψύξης, προκαλούν την αντιγραφή λίγων ή πολλών τμημάτων DNA του μικροοργανισμού. Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για μικροοργανισμούς όπως *S. pneumoniae*, *H. influenzae* και μηνιγγιτιδόκοκκο.

Η PCR (ανίχνευση γονιδίου πνευμονολυσίνης) αίματος μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ολικό αίμα ή πλάσμα ή ίζημα πολυμορφοπυρήνων που έχουν ληφθεί μετά από φυγοκέντρηση (buffy coat). Φαίνεται ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της εξέτασης ποικίλλει ανάλογα με το ποιο από τα παραπάνω βιολογικά υλικά χρησιμοποιείται.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Dallas των ΗΠΑ από τους Michelow και συν⁴ αναζητήθηκε το DNA του πνευμονιοκόκκου και στα τρία παραπάνω βιολογικά υλικά σε παιδιά με πνευμονία. Στο σύνολο των παιδιών με πνευμονία, η PCR αίματος –σε 1 ή περισσότερα από τα παραπάνω βιολογικά υλικά– ήταν θετική στο 44% και στο 5% των υγιών μαρτύρων (ειδικότητα 95%). Στην εργασία αυτή η PCR όταν έγινε μόνο στο πλάσμα ήταν θετική στο 23%, ενώ ήταν 29% σε ολικό αίμα και 32% σε ίζημα πολυμορφοπυρήνων. Από το σύνολο των παιδιών με θετική καλλιέργεια για πνευμονιόκοκκο και στα οποία έγινε PCR μέσα σε 48 ώρες από την διάγνωση και την έναρξη της αντιμικροβιακής αγωγής ήταν θετική σε όλες τις περιπτώσεις.

Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη η προηγούμενη χορήγηση αντιβιοτικών από το στόμα, όπως και η διάρκεια των συμπτωμάτων δεν επηρέασαν τα αποτελέσματα της PCR. Σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στην θετικοποίηση της PCR και παραμέτρων που

δείχνουν την σοβαρότητα της λοίμωξης, όπως αυξημένος αριθμός άωρων πολυμορφοπυρήνων, αυξημένες τιμές προκαλσιτονίνης, αναμφίβολη πύκνωση με ή χωρίς παραπνευμονική συλλογή, και παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομείο. Επίσης δεν βρέθηκε να επηρεάζεται το αποτέλεσμα της PCR από την ηλικία των παιδιών και τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο. Στην μελέτη αυτή τεκμηριώθηκε ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα στο 25% των παιδιών με πνευμονία.

Υπάρχουν επίσης μελέτες από δύο ακόμη σημαντικές ομάδες ερευνητών που έχουν ασχοληθεί ιδιαίτερα με τις λοιμώξεις του αναπνευστικού, την ομάδα των Dagan και συν⁷ από το Ισραήλ και εκείνη των Ruuskanen και συν⁸ από τη Φινλανδία, οι οποίες αναφέρουν λιγότερο ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αξία της PCR αίματος σε παιδιά με πνευμονία. Στις μελέτες αυτές αναφέρονται αρκετοί παράγοντες που στην κλινική εφαρμογή της PCR μπορεί να ελαττώσουν την ευαισθησία της (Πίνακας 3).

ΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΗ LATEX ΟΥΡΩΝ

Η διάγνωση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, στην εποχή της αυξημένης αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά, δημιούργησε την ανάγκη να βρεθούν τρόποι ταχείς και αξιόπιστοι που να συμβάλλουν στην τεκμηρίωση του πνευμονιοκόκκου ως αίτιο λοίμωξης.

Η ανίχνευση του πολυσακχαριδικού αντιγόνου C στα ούρα, που υπάρχει σε όλους τους ορότυπους του πνευμονιοκόκκου, γίνεται με το Binax NOW (Binax, Portland, ME), ταχεία μέθοδο με ανοσοχρωματογραφική μεμβράνη. Η μέθοδος εγκρίθηκε το 1999 από το FDA της Αμερικής για να χρησιμοποιείται στη διάγνωση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.

Αν και οι μελέτες ανίχνευσης του αντιγόνου στα ούρα σε ενήλικους με πνευμονιοκοκκική πνευμονία, βακτηριαιμία ή μηνιγγίτιδα έχουν δείξει υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας, οι μελέτες στα παιδιά δεν συμφωνούν για την αξιοπιστία της μεθόδου.

Οι Neuman και Harper⁹ διαπίστωσαν ότι η μέθοδος είχε υψηλή ευαισθησία σε παιδιά με αποδεδειγμένη διεισδυτική λοίμωξη από πνευμονιόκοκκο (βακτηριαιμία και τμηματική πνευμονία) (Πίνακας 4).

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τον Michelow και τους συνεργάτες του⁴ σε παιδιά με λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού. Η δοκιμασία ανίχνευσης αντιγόνου του πνευμονιοκόκκου στα ούρα ήταν θετική στο 55% παιδιών με λοίμωξη του αναπνευστικού,

Πίνακας 3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αξιοπιστία της PCR αίματος

1. Ο μικρός αριθμός των μικροβιακών κυττάρων στην αιμοκαλλιέργεια.
Σε 22 παιδιά με αιμοκαλλιέργεια θετική για πνευμονόκοκκο,⁸ είχαν:
23% λιγότερο από 1 μικροβιακά κύτταρα /ml
27% 1-9 μικροβιακά κύτταρα /ml
23% 10-100 μικροβιακά κύτταρα /ml
28% >100 μικροβιακά κύτταρα /ml
2. Η μη καλή αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης από το δείγμα, επιτρέπει την παραμονή σε αυτό συμπλόκων πορφυρίνης, τα οποία παρεμποδίζουν τη δράση της DNA πολυμεράσης.
3. Η αντιμικροβιακή θεραπεία πριν από τη λήψη του δείγματος ελαττώνει το ποσοστό των θετικών PCR.
4. Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με πνευμονιόκοκκο ακόμα και σε υγιή παιδιά αυξάνει το ποσοστό θετικοποίησης της PCR αίματος.

Πίνακας 4. Ανίχνευση του αντιγόνου του πνευμονιοκόκκου στα ούρα.⁹

Ομάδα παιδιών	Συνολικός αριθμός	Αριθμός θετικών παιδιών (%, 95% όρια αξιοπιστίας)
Βακτηριαμία	24	23 (96, 77-100)
Πυρετός, τμηματική πνευμονία	62	47 (76, 63-85)
Πυρετός, χωρίς διεισδυτική νόσο	181	28 (15, 11-22)
Απύρετα	79	6 (8, 3-16)

τα περισσότερα των οποίων είχαν τμηματική πνευμονία και στο 88% των παιδιών με πνευμονιοκοκκική νόσο, επιβεβαιωμένη με καλλιέργεια αίματος. Κατά αυτούς τους μελετητές δεν φάνηκε να επηρεάζεται η αξιοπιστία της εξέτασης από τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα με πνευμονιοκόκκο, ούτε από την ηλικία των ασθενών ούτε από το χρονικό διάστημα που πέρασε από την έναρξη της λήψης αντιβιοτικών και τη λήψη του δείγματος.

Σε αυτές τις μελέτες θα πρέπει να προστεθούν και εκείνες που υποστηρίζουν ότι αν και η ανίχνευση του αντιγόνου του πνευμονιοκόκκου στα ούρα παιδιών με διεισδυτική πνευμονιοκοκκική λοίμωξη φαίνεται ότι έχει υψηλή ευαισθησία, δεν μπορεί να διαχωρίσει τα παιδιά που νοσούν από πνευμονιοκοκκική νόσο από αυτά που είναι υγιή αλλά αποικισμένα στον ρινοφάρυγγα με πνευμονιοκόκκο.¹⁰ Μελέτες που έχουν γίνει σε περιοχές με υψηλό ποσοστό αποικισμού στο ρινοφάρυγγα κατέληξαν ότι η εξέταση αυτή δεν είναι χρήσιμη και δεν μπορεί να ξεχωρίσει τους ασθενείς που είναι αποικισμένοι από αυτούς με διεισδυτική νόσο από πνευμονιοκόκκο.

Σε μελέτη των Dowell και των συνεργατών του¹¹ φαίνεται ότι η μέθοδος απέτυχε να διαφοροδιαγνώσει τους ασθενείς με πνευμονιοκοκκική πνευμονία από εκείνους που ήταν απλά φορείς (Πίνακας 5).

Οι Domínguez και οι συν¹² διαπίστωσαν 86,7% ευαισθησία και 62,9% ειδικότητα σε παιδιά με πνευμονιοκοκκική πνευμονία. Το αντιγόνο του πνευμονιοκόκκου ανιχνεύτηκε στο 42,5% σε υγιή παιδιά αποικισμένα στον ρινοφάρυγγα με πνευμονιοκόκκο.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η ανίχνευση του αντιγόνου του πνευμονιοκόκκου στα ούρα σε παιδιά με λοίμωξη του αναπνευστικού είναι ένας έμμεσος δείκτης για το αίτιο της λοίμωξης, αλλά δεν μπορεί από μόνος του να τεκμηριώσει τον πνευμονιοκόκκο ως αίτιο.

Πίνακας 5. Ανίχνευση του αντιγόνου του πνευμονιοκόκκου στα ούρα με το Binax NOW ανάλογα με το εάν ήταν οι ασθενείς είχαν πνευμονία και εάν ήταν αποικισμένοι στον ρινοφάρυγγα με πνευμονιοκόκκο.¹¹

	Αριθμός θετικών εξετάσεων / Σύνολο εξετάσεων (%)		
	Αποικισμός του Ρ/Φ με ΠΝΚ		
	Ναι	Όχι	p
Παιδιά με πνευμονία	25/41 (61)	6/47 (13)	0,001
Μάρτυρες με δερματίτιδα ή διάρροια	43/80 (54)	25/118 (21)	0,001

ΑΝΤΙΓΟΝΟΥΡΙΑ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Ο *H. influenzae* τύπου b αποτελεί την αιτία για 400.000 θανάτους σε παιδιά ετησίως, και οι περισσότεροι από αυτούς αφορούν στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σε μελέτη¹³ που έγινε στο Μπανγκλαντές, και αφορούσε την αξία της χρήσης του Wellcogen – Latex test ούρων για τον μικροοργανισμό αυτό, παρατηρήθηκαν τα εξής:

- Σε υγιή παιδιά: τα 41 από τα 111 (37%) ήταν αποικισμένα με *H. influenzae*, και 2 από τα 41 (5%) είχαν θετικό Latex στα ούρα.
- Σε πρόσφατα εμβολιασθέντα παιδιά: 7 από τα 90 είχαν θετικό Latex στα ούρα, και αυτό μόνο την 1η ημέρα μετά τον εμβολιασμό.
- Σε άρρωστα παιδιά: το Latex στα ούρα ήταν θετικό σε όλες τις περιπτώσεις (100%) νόσου από *H. influenzae* επιβεβαιωμένης με καλλιέργεια (10 πνευμονίες, 35 μηνιγγίτιδες) και αρνητικό σε όλες τις περιπτώσεις που το αίτιο ήταν άλλος μικροβιακός παράγοντας (0 στα 104).

Επίσης το Latex συνέβαλε στην διάγνωση άλλων 16 πνευμονιών (εκτός δηλαδή από τις 10 που είχαν και θετική καλλιέργεια). Το Wellcogen – Latex απαιτεί θερμαινόμενα, αλλά μη συμπυκνωμένα δείγματα ούρων. Οι μελέτες¹⁴ στους ενήλικους δείχνουν για τα Latex με συσκευασμένα αντιδραστήρια Directigen και Bactigen ευαισθησία και ειδικότητα που ξεπερνούν το 90% για τον *H. influenzae* τύπου b.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mandell LA, Marrie TJ, Grossman RF, Chow AW, Hyland RH. Canadian guidelines for the initial management of community – acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. The Canadian Community-Acquired Pneumonia Working Group. Clin Infect Dis 2000; 31: 383-421.
2. BTS Guidelines for the Management of community acquired pneumonia in childhood. Thorax 2002; 57 (Supp.1): 1-24.
3. Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C, Kurki S, Heiskanen L, Juvonen H, et al. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 986-991.
4. Michelow IC, Lozano J, Olsen K, Goto C, Rollins NK, Ghaffar F, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory Infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing and urinary antigen detection. Clin Infect Dis 2002; 34: e1-e11.
5. Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr, Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group Incidence of CAP requiring hospitalization in Ohio. Arch Intern Med 1997; 157: 1709-1718.
6. Lin CJ, Chen PY, Huang FL, Lee T, Chi CS, Lin CY. Radiographic, clinical, and prognostic features of complicated and uncomplicated community-acquired lobar pneumonia in children. J Microbiol Immunol Infect 2006; 39: 489-495.
7. Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaffer F, et al. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36: 669-673.
8. Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O, Leinonen M, Mertsola J. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. J Clin Microbiol 1999; 37: 633-637.
9. Neuman MI, Harper MB. Evaluation of a rapid urine antigen assay for the detection of invasive

- pneumococcal disease in children. *Pediatrics* 2003; 112: 1279-1282.
10. Esposito S, Bosis S, Colombo R, Carlucci P, Faelli N, Fossali E, et al. Evaluation of rapid assay for detection of streptococcus pneumoniae urinary antigen among infants and young children with possible invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 365-367.
 11. Dowell SF, Garman RL, Liu G, Levine OS, Yang YH. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 824-825.
 12. Dominguez J, Blanco S, Rodrigo C, Azuara M, Gali N, Mainou A. et al. Usefulness of urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal pneumonia in children. *J Clin Microb* 2003; 41: 2161-2163.
 13. Saha SK, Baqui AH, El Areefin S, Qazi S, Billal DS, Islam M, et al. Detection of antigenuria for diagnosis of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Ann Trop Paediatr* 2006; 25: 329-336.
 14. Ajello GW, Bolan GA, Hayes PS, Lehmann D, Montgomery J, Feeley JC, et al. Commercial Latex Agglutination Tests for Detection of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* antigens in patients with bacteremic pneumonia. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1388-1391.

Ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης λοιμωδών παραγόντων

Κ. Καλλέργη

Η έκθεση σε λοιμογόνους παράγοντες συνεπάγεται κάποιου βαθμού χυμική ανοσιακή απάντηση. Η αρχική ανοσιακή απάντηση στην πρωτολοίμωξη είναι η παραγωγή ανοσοσφαιρινών IgM την 10^η ημέρα περίπου μετά την έκθεση. Συγχρόνως παράγονται και IgG σε χαμηλότερη συγκέντρωση από τις IgM. Ο χρόνος παραμονής των IgM στον ορό κυμαίνεται από 1-2 μήνες κατά μέσον όρο. Σταδιακά όσο ελαττώνονται οι IgM αυξάνει το επίπεδο των IgG οι οποίες παραμένουν για αρκετά χρόνια. Στην αναλοίμωξη η κινητική των αντισωμάτων διαφέρει. Η IgG είναι το κύριο αντίσωμα που παράγεται και συνήθως παραμένει για όλη τη ζωή του ατόμου.

Η μέτρηση των ανοσοσφαιρινών με ορολογικές μεθόδους έχει χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς. Οι ορολογικές τεχνικές είναι μια ευαίσθητη, ειδική και σχετικά φθηνή λύση για τη διάγνωση των λοιμώξεων και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας ή των άλλων άμεσων τεχνικών.¹

Η αιτιολογική διάγνωση της πρόσφατης λοίμωξης γίνεται με 2 τρόπους. Ο πρώτος είναι η ανίχνευση της ειδικής IgM σε ένα δείγμα ορού 1 εβδομάδα από την έναρξη των συμπτωμάτων. Αυτή η προσέγγιση αν και πιο χρήσιμη κλινικά, έχει αρκετές ιδιαιτερότητες που δυσκολεύουν την εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Θετική IgM, δεν σημαίνει πάντα πρόσφατη νόσο (περίπτωση εμμένουσας IgM). Αντίθετα, αρνητική IgM δεν την αποκλείει (ανοσιακή ανωριμότητα ή ανοσοκαταστολή). Η παρουσία ειδικής IgG είναι αίτιο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων όταν συνυπάρχει ρευματοειδής παράγων (RF) στον ορό, ή ψευδώς αρνητικών λόγω ανταγωνισμού της με την IgM. Τα προβλήματα ελαχιστοποιούνται με απομάκρυνση του RF ή της IgG προαναλυτικά, αλλά ο καλύτερος τρόπος παράκαμψης του προβλήματος είναι η χρήση μ-capture IgM τεχνικής.

Ο δεύτερος τρόπος διάγνωσης είναι ο έλεγχος για ορομετατροπή με ζεύγος δειγμάτων ορού (οξείας φάσης και ανάρρωσης), που απέχουν μεταξύ τους 2-3 εβδομάδες. Ως ορομετατροπή ή ορομεταστροφή ορίζεται ο 4πλασιασμός του τίτλου των αντισωμάτων μεταξύ των δειγμάτων ορού που εξετάζονται συγχρόνως. Έχει μεγάλη αξιοπιστία, αλλά η διάγνωση γίνεται αναδρομικά. Στην καθημερινή πράξη η ορομετατροπή σπάνια αξιοποιείται για θεραπευτικούς λόγους.

Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος ορός οξείας φάσης, η εμφάνιση υψηλού τίτλου IgG είναι ενδεικτική, αλλά όχι αποδεικτική οξείας λοίμωξης. Δηλαδή, διαγνωστική αξία έχει η άνοδος του τίτλου και όχι το ύψος του.

ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Υπάρχουν πολλές ορολογικές μέθοδοι, αλλά στα εργαστήρια ρουτίνας χρησιμοποιούνται η ανοσοενζυμική (ELISA), ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA) και σπανιότερα η σύνδεση συμπληρώματος (CF), η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης (HI) και οι συγκολλητινοαντιδράσεις (PA).²

Η CF ανιχνεύει ολικά αντισώματα –κυρίως IgM– και είναι κατάλληλη για έλεγχο της πρόσφατης λοίμωξης με ζεύγος δειγμάτων ορού. Είναι προτυπωμένη, δίνει αποτέλεσμα σε τίτλο, αλλά είναι πολύπλοκη με χαμηλή ευαισθησία.

Ο IFA προσδιορίζει εκτός από τον τίτλο, και την τάξη των αντισωμάτων. Είναι χρονοβόρος και δύσκολος στην αξιολόγηση λόγω υποκειμενικών αποτελεσμάτων.

Η ELISA έχει δυνατότητα αυτοματοποίησης και υψηλή ευαισθησία, ενώ η ειδικότητα της εξαρτάται από το αντιγόνο που χρησιμοποιεί. Τα περισσότερα εμπορικά συσκευασμένα αντιδραστήρια (kits) που κυκλοφορούν δεν είναι προτυπωμένα. Τα αποτελέσματά της είναι ποιοτικά ή εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες και είναι δύσκολο να ανιχνεύσει την ορομετατροπή.

Η HI ελέγχει κυρίως την ανοσία και την αποτελεσματικότητα των εμβολίων, έχει υψηλή ευαισθησία και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε τίτλο.

Οι συγκολλητινοαντιδράσεις είναι ταχείες και δίνουν αποτελέσματα ποιοτικά ή ημιποσοτικά. Συνήθως είναι εξετάσεις διαλογής (screening tests).

Οι πιο πάνω μέθοδοι δε δίνουν αναγκαστικά ταυτόσημα αποτελέσματα, γιατί ανιχνεύουν διαφορετικού τύπου και ειδικότητας αντισώματα. Επομένως, οι τίτλοι αντισωμάτων από διαφορετικές μεθόδους δεν είναι συγκρίσιμοι.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Η ορολογική διάγνωση έχει πρωτεύοντα ρόλο στην περίπτωση των βακτηρίων που προκαλούν τις αναφερόμενες ως άτυπες πνευμονίες. Αυτά τα άτυπα βακτήρια καλλιεργούνται δύσκολα, με την έννοια ότι απαιτούν ειδικά υλικά και συνθήκες για να αναπτυχθούν. Μερικές φορές απαιτούν επίπεδα βιοασφάλειας που δεν υπάρχουν στα κοινά εργαστήρια. Για όλα αυτά τα βακτήρια που είναι στην πλειονότητά τους ενδοκυττάρια, η ορολογική προσπέλαση δε συνιστά την εύκολη λύση, αλλά αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για τη διάγνωση.

Mycoplasma pneumoniae

Η ανοσιακή απάντηση στρέφεται έναντι γλυκολιπιδικών και πρωτεϊνικών αντιγόνων του μυκοπλάσματος. Αρχικά ανιχνεύεται η IgM και 2 εβδομάδες αργότερα η IgG. Τα επίπεδα της IgM είναι συχνά ανιχνεύσιμα για μήνες ή και χρόνια, ενώ υπάρχει μια ποικιλία μη ειδικών αντισωμάτων που βοηθούν στη διάγνωση.³

Μέθοδος αναφοράς είναι η CF που ανιχνεύει αντισώματα έναντι του γλυκολιπιδίου. Μετά ένα μήνα ο τίτλος ελαττώνεται σταδιακά και παραμένει χαμηλός για 3-4 χρόνια.⁴ Κριτήρια για τη διάγνωση είναι ο τετραπλασιασμός του τίτλου σε ζεύγος ορών, ή τίτλος $\geq 1:32$ σε ορό ανάρρωσης. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 80-95% για το πρώτο κριτήριο και 60% για το δεύτερο. Υπάρχουν διασταυρούμενες αντιδράσεις που παρατηρούνται σε ποσοστό 10% σε άτομα με βακτηριακή μηνιγγίτιδα ή παγκρεατίτιδα.^{4,5} Η CF μετρά κυρίως IgM και η διαγνωστική της αξία περιορίζεται στην ανίχνευση της πρόσφατης λοίμωξης κυρίως σε παιδιά.³ Σταδιακά αντικαθίσταται από την ELISA.

Υπάρχουν αρκετές ELISA στο εμπόριο που διαφέρουν στο αντιγόνο που χρησιμοποιούν. Βοηθούν τη διάγνωση μόνο εφόσον έχουν υψηλή ειδικότητα. Σε συγκριτική μελέτη, απόλυτα ειδική αποδείχτηκε μόνο η μ -capture IgM-ELISA, ενώ η ειδικότητα των υπολοίπων κυμαινόταν από 25-90%.⁶ Η IgM-ELISA ανιχνεύει τη λοίμωξη με ένα δείγμα ορού, με την προϋπόθεση ότι η λήψη θα γίνει μετά τη 10^η ημέρα νόσου. Σε δείγματα θετικά με CF, οι IgM-ELISA έχουν ευαισθησία και ειδικότητα >99% και 98% αντίστοιχα. Η ειδικότητα παραμένει υψηλή, αλλά η ευαισθησία ελαττώνεται όταν χρησιμοποιηθεί η IgG-ELISA για τη διάγνωση.⁷ Υπάρχουν εμπορικά συσκευασμένα αντιδραστήρια με ταχείες ELISA μεμβράνης με εύκολη διαδικασία και χρόνο εξέτασης <15 min.

Η ImmunoCard® (Meridian) μετρά IgM αντισώματα και όπως κάθε IgM τεχνική έχει ψευδώς θετικά αποτελέσματα όταν υπάρχει RF στον ορό,³ αλλά είναι εξαιρετικά αξιόπιστη, ιδίως όταν χρησιμοποιείται σε παιδιά. Η Remel® EIA ανιχνεύει ολικά αντισώματα (IgG + IgM) σε όλους τους ορούς με τίτλο CF $\geq 1:64$. Και τα δύο δεν απαιτούν ιδιαίτερο εξοπλισμό και έχουν θετική και αρνητική διαγνωστική αξία >90%.^{4,8}

Οι συγκολλητινοαντιδράσεις με απλά ή ανασυνδυασμένα αντιγόνα δεν προσφέρουν κανένα πλεονέκτημα συγκριτικά με άλλες τεχνικές, εκτός ίσως της απλότητας στην εκτέλεση. Κυκλοφορούν σε μορφή κάρτας (ποιοτικές) ή πλάκας μικροτιτλοποίησης (ποσοτικές) και τίτλος $\geq 1:160$ ή 4πλασιασμός του θεωρούνται ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης.^{3,8} Οι ψυχροσυγκολλητίνες είναι μη ειδικά IgM αντισώματα, εμφανίζονται μια εβδομάδα μετά τη λοίμωξη και παραμένουν για 3-5 μήνες. Τίτλος $\geq 1:32$ είναι αρκετός για τη διάγνωση μυκοπλασματικής πνευμονίας. Υψηλοί τίτλοι συσχετίζονται με βαρύτερη νόσο. Ανιχνεύονται στο 50-60% των περιπτώσεων πνευμονίας και παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις.⁴

Συμπερασματικά η ELISA είναι μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση. Είναι πιο ευαίσθητη από την CF και έχει ικανοποιητική ειδικότητα. Οι εμπορικές IgM-ELISA (κλασσική και ταχείες) συνιστούν την πλέον αξιόπιστη προσέγγιση της λοίμωξης στα παιδιά. Αφήνουν αδιάγνωστες μερικές πολύ πρώιμες λοιμώξεις, που μπορεί να διαγνωστούν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή αργότερα με IgM-ELISA στον ορό ανάρρωσης. Για ακόμη ταχύτερα και ασφαλέστερα αποτελέσματα συνδυάζονται εξ αρχής μ -capture IgM-EIA και PCR με ποσοστό επιτυχίας >90% στην οξεία φάση της νόσου.

Chlamydia και Chlamydophila

Τα επιφανειακά αντιγόνα του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) επάγουν έντονη ανοσιακή απάντηση. Οι κοινοί αντιγονικοί επίτοποι οδηγούν σε διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των χλαμυδιακών ειδών. Έχουν ταυτοποιηθεί τα ειδικά αντιγόνα του είδους, αλλά δεν κυκλοφορούν πολλά εμπορικά συσκευασμένα αντιδραστήρια ρουτίνας βασισμένα σε αυτά. Δεν υπάρχει ορολογική μέθοδος που να ανιχνεύει ικανοποιητικά όλες τις χλαμυδιακές λοιμώξεις. Κατά καιρούς έχουν προταθεί οι CF, ELISA και ο μικροανοσοφθορισμός (MIF) για την ανίχνευση αντισωμάτων με ειδικότητα ομάδας, είδους, ακόμη και οροτύπου των χλαμυδίων. Η CF ανιχνεύει αντισώματα έναντι του LPS, που είναι ειδικά του γένους, κοινά για όλα τα χλαμύδια, ενώ ο MIF χρησιμοποιεί αντιγόνο από τα στοιχειώδη σωματίδια ειδικά του είδους.⁹

Chlamydophila psittaci

Όταν υπάρχει κλινική υποψία ψιττάκωσης η CF δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα με τον

έλεγχου της ορομετατροπής και εμφανίζει αρκετά υψηλούς τίτλους.⁹ Επί απουσίας του τυπικού ιστορικού (έκθεση σε πτηνά) το θετικό αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται σε λοίμωξη από *C. pneumoniae* λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης (κοινό LPS). Το CDC θεωρεί επιβεβαιωμένη τη λοίμωξη όταν υπάρχει συμβατή κλινική εικόνα και ένα από τα παρακάτω εργαστηριακά ευρήματα: τίτλος IgM $\geq 1:16$ (MIF), καλλιέργεια θετική, 4πλασιασμός του τίτλου με CF ή MIF (τουλάχιστον 1:32) σε δείγματα που απέχουν χρονικά 2 εβδομάδες. Τίτλος τουλάχιστον 1:32, σε ένα δείγμα ορού με συμβατή κλινική εικόνα σημαίνει πιθανή περίπτωση.¹⁰

Chlamydia trachomatis

Ο MIF είναι η μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση της πνευμονίας στα βρέφη και ένας μόνο τίτλος IgM $\geq 1:32$ υποστηρίζει τη διάγνωση σε βρέφη με συμβατή κλινική εικόνα. Τα IgG αντισώματα δεν βοηθούν, γιατί το βρέφος όταν παρουσιάζεται με τα κλινικά συμπτώματα της πνευμονίας, έχει ακόμα υψηλό τίτλο μητρικών IgG.¹¹ Η IgM (MIF) είναι παρούσα στο σύνολο σχεδόν των βρεφών με πνευμονία και σε περίπου 30% αυτών με επιπεφυκίτιδα.

Chlamydomphila pneumoniae

Στην πρωτολοίμωξη τα IgM αντισώματα εμφανίζονται σε 2-3 εβδομάδες από την έναρξη της νόσου ενώ τα IgG την 6^η-8^η εβδομάδα. Στην αναλοίμωξη η IgM είναι απύουσα ή σε χαμηλούς τίτλους και η IgG εμφανίζεται σε 1-2 εβδομάδες.¹² Η χρησιμότητα της IgA ως δείκτη οξείας λοίμωξης δεν έχει διευκρινιστεί.

Ο MIF είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για τη διάγνωση της λοίμωξης, ενώ η CF παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και διασταυρούμενες αντιδράσεις.¹¹ Ο MIF είναι δύσκολη μέθοδος και ελάχιστα προτυπωμένα και αξιόπιστα αντιδραστήρια κυκλοφορούν στο εμπόριο. Όμως είναι η μόνη προς το παρόν αποδεκτή μέθοδος για διαγνωστική χρήση.¹² Το 2001 το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) θέσπισε κριτήρια σε μια προσπάθεια προτυποποίησης του MIF για τη διάγνωση της λοίμωξης από *C. pneumoniae*. Οι οδηγίες αφορούν στην παραγωγή του αντιγόνου, τη διαδικασία εξέτασης, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη διασφάλιση ποιότητας, και πρέπει να τηρούνται αυστηρά (Πίνακας 1). Εναλλακτικά, η

Πίνακας 1. Συστάσεις για τη χρήση του MIF (*C. pneumoniae*)

Αντιγόνο	Κεκαθαρμένα στοιχειώδη σωματίδια
Δείγμα	Ζεύγος δειγμάτων ορού με χρονική απόσταση 4-8 εβδομάδες
Πορεία δοκιμασίας	Αρχική αραίωση 1:8 ή 1:16 και υποδιπλάσιες αραιώσεις Απομάκρυνση της IgG με αντι-IgG πριν από τον έλεγχο IgM
Αποτελέσματα	Διάβασμα με προσοφθάλμιο 10× και αντικειμενικό 40×
Αξιολόγηση	Οξεία λοίμωξη: IgM $\geq 1:16$ ή 4πλασιασμός τίτλου IgG Πιθανή οξεία λοίμωξη: IgG $\geq 1:512$ Υποθετική παρελθούσα λοίμωξη: IgG $\geq 1:16$
Διασφάλιση	Θετικός και αρνητικός μάρτυρας σε κάθε δοκιμασία.
Ποιότητας	Έλεγχος τίτλου θετικού μάρτυρα για επαναληψιμότητα. Φύλαξη ορών και αντιδραστηρίων όπως αναφέρεται

CID 2001, 33:492-503 (τροποποιημένος)

ELISA μπορεί να παρακάμψει μερικά προβλήματα του MIF, αλλά σύμφωνα με το CDC κανένα από τα εμπορικά συσκευασμένα αντιδραστήρια ELISA δεν έχει την αναγκαία ευαισθησία και ειδικότητα συγκρινόμενο με τον MIF.¹³ Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, λαμβάνοντας σοβαρά υπόψη την κινητική των αντισωμάτων. Η χρήση ενός μόνον δείγματος ορού για τη διάγνωση πρόσφατης λοίμωξης πρέπει να αποφεύγεται, εκτός αν υπάρχει θετική IgM. Ο τίτλος $\geq 1:512$ ως τεκμήριο πρόσφατης λοίμωξης αξιολογείται με επιφύλαξη, ιδιαίτερα στα μεγαλύτερα παιδιά και εφήβους.^{10,11}

Legionella pneumophila

Περίπου 75% των ασθενών ορομετατρέπουν εντός εβδομάδων ή μηνών και πολλές φορές είναι αναγκαίο να εξετάζονται αρκετά δείγματα ανάρρωσης. Ελέγχονται απαραίτητα και οι 3 τάξεις των ανοσοσφαιρινών. Η IgM είναι πτωχός δείκτης για την παρουσία οξείας λοίμωξης γιατί μπορεί να παραμείνει για περισσότερο από ένα χρόνο.

Μέθοδος αναφοράς είναι ο IFA με ευαισθησία 75-80% και ειδικότητα >99% όταν χρησιμοποιείται αντιγόνο *L. pneumophila* οροτύπου 1.¹⁴ Αυτό κάνει την ορομετατροπή δοκιμασία με υψηλή διαγνωστική αξία, ακόμη και σε πληθυσμό με χαμηλό επιπολασμό νόσου. Η χρήση πολυδύναμου αντιγόνου ελαττώνει την ειδικότητα. Για τη διάγνωση απαιτείται ορομετατροπή με τίτλο $\geq 1:128$. Απλός τίτλος $\geq 1:256$ είναι ένδειξη λοίμωξης μόνο κατά τη διάρκεια επιδημιών.

Οι συγκολλητινοαντιδράσεις ελέγχουν πολλούς ορούς συγχρόνως με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και είναι θετικές στο 40% των περιπτώσεων την 1^η εβδομάδα νόσου. Η ELISA έχει θέση δοκιμασίας διαλογής (screening test) και τα αποτελέσματά της επιβεβαιώνονται με IFA.¹⁵

Τα αναδρομικά αποτελέσματα και οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα βακτήρια (*Mycoplasma*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Campylobacter*), είναι τα κύρια μειονεκτήματα της ορολογικής διάγνωσης. Σήμερα οι ορολογικές δοκιμασίες είναι υποβοηθητικές των άλλων άμεσων μεθόδων.

Coxiella burnetii

Το βακτήριο εμφανίζει το φαινόμενο της ποικιλίας φάσεων (I και II) και αυτό χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της πρόσφατης λοίμωξης, όπου ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι της φάσης II είναι υψηλότερος από αυτόν της φάσης I.

Ο IFA είναι η μέθοδος αναφοράς για την ορολογική διάγνωση του πυρετού Q, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και χωρίς διασταυρούμενες αντιδράσεις. Περίπου 90% των νοσούντων έχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα την 3^η εβδομάδα της νόσου που ελαττώνονται βαθμιαία εντός 12 μηνών. Η IgM δεν ανιχνεύεται πέραν του εξαμήνου. Η πρόσφατη λοίμωξη τεκμηριώνεται με 4πλασιασμό του τίτλου. Επίσης, τίτλος IgG $\geq 1:200$ ή και IgM $\geq 1:50$ έναντι της φάσης II είναι ισχυρή ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης. Η επιλογή του οριακού τίτλου (cut-off) εξαρτάται και από τον πληθυσμό ελέγχου.

Κυκλοφορεί ένα εμπορικό αντιδραστήριο ELISA για την ανίχνευση της IgM φάσης II, αλλά η μέθοδος δεν είναι προτυπωμένη. Εναλλακτικά έχουν δοκιμαστεί συγκολλητινοαντιδράσεις και η CF, που υπολείπονται σε ειδικότητα (διασταυρούμενες με *Bartonella*, *Legionella*).¹⁶

Bordetella pertussis

Ο έλεγχος της ανοσίας γίνεται σε εργαστήρια αναφοράς με δοκιμασία εξουδετέρω-

σης (NT). Στα κλινικά εργαστήρια η ELISA είναι η μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση της λοίμωξης. Οι IgM και IgA απαντήσεις στην τοξίνη (PT) είναι δείκτης λοίμωξης από την *B. pertussis* και 90% των ασθενών έχουν ανιχνεύσιμα IgG αντισώματα την 3^η-4^η εβδομάδα από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η ανοσιακή απάντηση εξαρτάται από την ηλικία και την προηγούμενη έκθεση στο βακτήριο ή τα αντιγόνα του λόγω εμβολιασμού. Η εμφάνιση ορομετατροπής ή η σημαντική αύξηση του τίτλου της IgG έναντι της PT θεωρείται ότι είναι ο πιο ευαίσθητος και ειδικός δείκτης λοίμωξης. Όμως το δείγμα οξείας φάσης ουσιαστικά χάνεται λόγω καθυστέρησης στην έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων. Ο έλεγχος είναι δύσκολος στα εμβολιασμένα παιδιά. Κυκλοφορεί στο εμπόριο ELISA για έλεγχο εφήβων και ενηλίκων. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ διαφόρων διαγνωστικών μεθόδων έδειξαν ότι η ορολογική προσέγγιση είναι η ασφαλέστερη, αν και η ευαισθησία της δεν ξεπερνά το 60-95%.¹⁷ Σύγκριση επιπέδων αντισωμάτων μητέρας-παιδιού βοηθά στη διάγνωση του βρεφικού κοκκύτη.

Francisella tularensis

Τα αντισώματα ανιχνεύονται την 1^η εβδομάδα από την έναρξη των συμπτωμάτων και την 2^η εβδομάδα 90-95% των ορών είναι θετικοί. Οι ανοσοσφαιρίνες G, A και M εμφανίζονται ταυτόχρονα και παραμένουν πάνω από 10 χρόνια. Η παρουσία της IgM δεν προδικάζει την παρούσα ή την πρόσφατη λοίμωξη.

Η μέθοδος αναφοράς είναι η συγκολλητινοαντίδραση και τίτλος $\geq 1:160$ αξιολογείται ως θετικός όταν υπάρχει συμβατή κλινική εικόνα και δεν υπάρχει ιστορικό εμβολιασμού ή προηγούμενης έκθεσης. Η επιβεβαίωση απαιτεί 4πλάσια διαφορά τίτλου μεταξύ ορού οξείας φάσης και ανάρρωσης και ο ένας ορός πρέπει να έχει τίτλο τουλάχιστον 1:160. Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις που εμφανίζονται με την Βρουκέλλα είναι σε χαμηλούς τίτλους και δεν επηρεάζουν την αξιολόγηση.¹⁸ Άλλες μέθοδοι όπως IFA και ELISA δεν είναι σε ευρεία χρήση.²

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Στις ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού οι ορολογικές μέθοδοι αποτελούν τη δεύτερη και πολλές φορές την τρίτη επιλογή για τη διάγνωση της πρόσφατης νόσου. Εξαίρεση αποτελεί η φαρυγγίτιδα από τον EBV όπου η ορολογική διάγνωση είναι η μέθοδος αναφοράς. Με τον ορολογικό έλεγχο διαπιστώνεται η αιτιολογική σχέση του ιού που ανιχνεύτηκε στο φάρυγγα με τη νόσο. Αυτό ισχύει κυρίως για ιούς που αποικίζουν το ανώτερο αναπνευστικό για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως οι Adeno-ιοί και οι Entero-ιοί.

Στο σημερινό κλινικό εργαστήριο η μέτρηση των αντισωμάτων γίνεται πολύ συχνά για να διαπιστωθεί η πρόσφατη λοίμωξη, να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των άμεσων τεχνικών, να ελεγχθεί η ανοσία και σε μερικές περιπτώσεις η αποτελεσματικότητα των εμβολίων. Οι εργαστηριακές μέθοδοι είναι οι κλασικές CF και HI και οι νεώτερες IFA και ELISA. Η δοκιμασία εξουδετέρωσης (NT) είναι η μέθοδος αναφοράς για τις ιογενείς λοιμώξεις και γίνεται σε ειδικά εργαστήρια. Οι πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των ιών της ίδιας οικογένειας και η αναδρομική διάγνωση, είναι τα κυριότερα μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων. Οι ιδιαιτερότητες που υπάρχουν στην ανοσιακή απάντηση των νεογνών, των βρεφών και των ανοσοκατασταλασμένων ατόμων, ελαττώνουν τη διαγνωστική τους αξία στη συγκεκριμένη ομάδα πληθυσμού.

Influenza virus

Η συστηματική ανοσιακή απάντηση στρέφεται έναντι των επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών (αιμοσυγκολλητίνης – HA και νευραμινιδάσης - NA) και των δομικών πρωτεϊνών (νουκλεοπρωτεΐνης - NP και M-πρωτεΐνης) του ιού.

Τα αντισώματα έναντι της HA εμφανίζονται 2 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη, παραμένουν ανιχνεύσιμα για χρόνια και είναι προστατευτικά για τον συγκεκριμένο υπότυπο που προκάλεσε τη νόσο.¹⁹

Η NT είναι η μέθοδος αναφοράς για τον έλεγχο αυτών των αντισωμάτων και τίτλος 1:8 δηλώνει προστασία (ανοσία). Η HI χρησιμοποιείται εναλλακτικά στα κλινικά εργαστήρια, αν και δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση με την NT. Τίτλοι $\geq 1:40$ θεωρούνται προστατευτικοί ενώ 1:10 έως 1:20 συνδέονται με μικρότερου βαθμού προστασία.^{19,20} Η HI χρησιμοποιείται επίσης σε επιδημιολογικές μελέτες ελέγχου ανοσίας του πληθυσμού όπως και για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων.

Η CF μετρά αντισώματα έναντι της NP, που είναι κοινή μεταξύ των στελεχών του ίδιου οροτύπου. Διαχωρίζει τους ορότυπους A και B του ιού, αλλά όχι τον υπότυπο που προκάλεσε τη λοίμωξη. Τα αντισώματα που ανιχνεύει δεν είναι προστατευτικά και εξαφανίζονται σε εβδομάδες ή μήνες. Χρησιμοποιείται στη διάγνωση της πρόσφατης λοίμωξης με τον έλεγχο της ορομετατροπής. Λόγω της διαχρονικής σταθερότητας της NP δεν χρειάζεται να παρασκευαστεί καινούριο αντιγόνο κάθε φορά που αναδύεται ένας νέος υπότυπος γρίπης. Η μέθοδος είναι προτυπωμένη, αλλά τείνει να αντικατασταθεί από τις ELISA που είναι πιο προσιτές στα Εργαστήρια.

Η ELISA είναι πιο ευαίσθητη από την CF και διαχωρίζει τις τάξεις των ανοσοσφαιρινών, αλλά χρειάζεται προτύπωση. Το αντιγόνο της μπορεί να είναι ειδικό για τους ορότυπους ή τους υποτύπους του ιού. Σε ερευνητική μελέτη έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τον έλεγχο της ανοσιακής απάντησης παιδιών με γρίπη των πτηνών.²⁰

Respiratory Syncytial virus

Τα μητρικά αντισώματα φτάνουν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στην ηλικία των 6 μηνών περίπου. Στην πρωτολοίμωξη η IgM ανιχνεύεται από την 1^η εβδομάδα ενώ η IgG την 2^η. Στις αναλοιμώξεις εμφανίζονται όλες οι τάξεις των ανοσοσφαιρινών και μετά από 3 επεισόδια, οι τίτλοι τους πλησιάζουν αυτούς των ενηλίκων.²¹

Η οροδιάγνωση με CF απαιτεί ζεύγος δειγμάτων ορού και δεν είναι αξιόπιστη σε βρέφη <3 μηνών, τα οποία και αποτελούν σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού που ελέγχεται για RSV λοίμωξη. Η ELISA ανιχνεύει την ορομετατροπή σε ποσοστό 50% σε βρέφη <6 μηνών. Η ορομετατροπή μπορεί να καθυστερήσει έως και 4-6 εβδομάδες. Η IgM δεν ανιχνεύεται σε παιδιά ηλικίας <6 μηνών και ως εκ τούτου η διάγνωση αποκλείεται στο χρόνο που θα ήταν κλινικά χρήσιμη. Τα ειδικά αντισώματα ανιχνεύονται νωρίτερα στις εκκρίσεις και αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βοηθητική δοκιμασία παράλληλα με την ανίχνευση αντιγόνου.²¹ Μερικά εργαστήρια χρησιμοποιούν στον έλεγχο ρουτίνας IgM- ELISA ή CF όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής άμεσων τεχνικών.

Η αναδρομική διάγνωση και η απουσία ικανοποιητικής ανοσιακής απάντησης σε βρέφη <6 μηνών περιορίζουν τη διαγνωστική αξία των ορολογικών μεθόδων και την κλινική τους χρησιμότητα. Αντίθετα βρίσκουν εφαρμογή σε επιδημιολογικές μελέτες και μετά τον εμβολιασμό.

Parainfluenza viruses (PIVs)

Τα προστετευτικά αντισώματα έναντι των επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών (HN) του ιού εμφανίζονται νωρίς, 1-2 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη και παραμένουν για αρκετά χρόνια. Απαιτούνται όμως επανειλημμένες λοιμώξεις για αποτελεσματική προστασία.²²

Τα αντισώματα που συνδέουν το συμπλήρωμα εμφανίζονται 1-2 εβδομάδες αργότερα και παραμένουν για περίπου 1 χρόνο. Στις περισσότερες πρωτολοιμώξεις παράγονται IgM και η ανίχνευσή τους με ELISA ή IFA είναι ισχυρή ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης. Απόδειξη είναι ο 4πλασιασμός του τίτλου που ελέγχεται με αρκετές μεθόδους (CF, HI, ELISA). Τα παιδιά <6 μηνών δεν απαντούν κανονικά λόγω ανωριμότητας του ανοσοποιητικού, αλλά και της παρουσίας του μητρικού αντισώματος. Όταν δεν υπάρχει άλλος τρόπος διάγνωσης πλην της ορολογικής, η καλύτερη επιλογή είναι η IgM- ELISA γιατί οι συμβατικές μέθοδοι CF και HI παρουσιάζουν περιορισμένη ειδικότητα.

Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους παραμυξοϊούς και οι ετεροτυπικές μεταξύ των PIVs, δυσκολεύουν τη διάγνωση που είναι αναδρομική και έχει κυρίως επιδημιολογικό ενδιαφέρον.

Adeno-virus

Τα αντισώματα που συνδέουν το συμπλήρωμα αναπτύσσονται 1 εβδομάδα μετά τη λοίμωξη, διατηρούνται για ένα χρόνο περίπου και στρέφονται έναντι του αντιγόνου της εξόνης που είναι κοινό για όλους τους αδενοϊούς. Τα εξουδετερωτικά στρέφονται έναντι του συγκεκριμένου οροτύπου που προκάλεσε τη λοίμωξη και παραμένουν πάνω από δεκαετία σε σταθερό τίτλο. Η IgM εμφανίζεται στο 20-50% των περιπτώσεων αλλά η εμφάνιση IgG καθυστερεί ή λείπει τελείως σε ανοσοκαταστολή.

Η οροδιάγνωση απαιτεί ανίχνευση IgM ή 4πλασιασμό τίτλου IgG σε ορούς που απέχουν 2-4 εβδομάδες.

Για τις συνηθισμένες περιπτώσεις αρκεί ο έλεγχος με ELISA (IgM) ή CF (ορομετατροπή). Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν το αντιγόνο εξόνης και ανιχνεύουν ικανοποιητικά όλους τους τύπους. Η CF, προτυπωμένη και φθηνή υστερεί σε ευαισθησία. Μόνο 50% των παιδιών έχουν θετικό αποτέλεσμα. Η ELISA είναι πιο ευαίσθητη και πολλά εργαστήρια την έχουν εντάξει στη ρουτίνα τους παρά το υψηλό κόστος και την έλλειψη προτύπωσης. Ο IFA φαίνεται να έχει την ίδια ευαισθησία με την ELISA.

Η αιτιολογική διάγνωση ενός συνδρόμου που κλινικά συνδέεται με περιορισμένο αριθμό οροτύπων γίνεται σε ειδικά κέντρα αναφοράς με μεθόδους όπως NT ή HI. Η τεκμηρίωση της συμμετοχής του συγκεκριμένου οροτύπου στη νόσο γίνεται με τη διαπίστωση της ορομετατροπής χωρίς να λείπουν και οι ετεροτυπικές αντιδράσεις σε ποσοστό 25%.²³

Οι περιορισμοί στην ορολογική διάγνωση έχουν σχέση με την χαμηλή ευαισθησία στην ανίχνευση της IgM, τις ψευδώς θετικές αντιδράσεις και την αναδρομική διάγνωση. Οι ορολογικές δοκιμασίες αποτελούν μέρος της εργαστηριακής προσέγγισης, που περιλαμβάνει καλλιέργεια, ανίχνευση αντιγόνου και PCR. Κάθε εξέταση συμπληρώνει και επιβεβαιώνει τις υπόλοιπες.

SARS – CoV

Η ορομετατροπή συμβαίνει 2-3 εβδομάδες μετά τη νόσο και η ορολογική διάγνωση έχει περιορισμένη χρησιμότητα κατά την οξεία φάση. Η εμφάνιση των IgM και IgG αντισωμάτων γίνεται συγχρόνως, τα IgM παραμένουν για 11 περίπου εβδομάδες, ενώ τα IgG

Πίνακας 2. Συνδυασμός αντισωμάτων για διάγνωση λοιμώδους μονοπυρήνωσης

Ερμηνεία ευρημάτων	Αντίσωμα έναντι αντιγόνων EBV		
	VCA-M	VCA-G	EBNA-G
Οροαρνητικό	—	—	—
Παρούσα λοίμωξη	+++	++	—
Πρόσφατη λοίμωξη	+	++	—
Παρελθούσα λοίμωξη	—	+	+

(-): απουσία αντισωμάτων, (+): παρουσία αντισωμάτων, (++) ή (+++): παρουσία αντισωμάτων σε υψηλό ή πολύ υψηλό τίτλο

για μήνες και πιθανόν για χρόνια.

Η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση είναι η NT. Πρόσφατες συγκριτικές μελέτες έδειξαν ότι η NT παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ειδικότητα, ενώ η ELISA την μεγαλύτερη ευαισθησία για τη διάγνωση της νόσου.²⁴

Epstein-Barr Virus (EBV)

Η ορολογική διάγνωση είναι η μέθοδος αναφοράς και εκλογής για την φαρυγγίτιδα από *Epstein-Barr Virus (EBV)*. Ένα δείγμα ορού οξείας φάσης είναι αρκετό για τη διάγνωση στο 90-95% των περιπτώσεων της λοιμώδους μονοπυρήνωσης, με ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι των καψιδικών (VCA - M, VCA - G) και πυρηνικών (EBNA - G) αντιγόνων του ιού. Η πρωτολοίμωξη χαρακτηρίζεται από την απουσία των EBNA-G και θετική VCA-M (Πίνακας 2). Μόνο σε λίγες περιπτώσεις με δυσερμήνευτα αποτελέσματα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση με Western blot ή avidity test. Τα ετερόφιλα αντισώματα δεν εμφανίζονται πάντα σε παιδιά βρεφικής ή νηπιακής ηλικίας και επιβάλλεται η ειδική αιτιολογική διάγνωση. Μέθοδος αναφοράς είναι ο IFA, αλλά οι τελευταίες βελτιωμένες ELISA είναι μια ευαίσθητη και ειδική εναλλακτική πρόταση.²⁵

Picornavirus

Ο μεγάλος αριθμός οροτύπων δεν επιτρέπει τη χρήση ορολογικών μεθόδων διάγνωσης για τους ρινοϊούς και δεν κυκλοφορούν στο εμπόριο σχετικά αντιδραστήρια. Το ίδιο ισχύει και για τους εντεροϊούς. Οι ορολογικές μέθοδοι στερούνται διαγνωστικής αξίας και δεν έχουν λόγο χρήσης. Η ορολογική επιβεβαίωση της λοίμωξης από ένα συγκεκριμένο ορότυπο, σε καιρό επιδημιών, γίνεται με NT σε εργαστήρια αναφοράς.

ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Toxocara

Η ανίχνευση των αντισωμάτων είναι ο μόνος τρόπος επιβεβαίωσης της κλινικής διάγνωσης σε υποψία σπλαγγχνικής τοξοκαρίασης. Η ELISA είναι η μέθοδος εκλογής και υπάρχουν σχετικά συσκευασμένα αντιδραστήρια στο εμπόριο.

Η ευαισθησία είναι περίπου 80% αλλά ο υπολογισμός της πραγματικής ευαισθησίας και ειδικότητας δεν είναι εύκολος γιατί δεν υπάρχει η αντίστοιχη παρασιτολογική εξέταση αναφοράς. Η ευαισθησία έχει υπολογισθεί σε ομάδες ασθενών με συμπτώματα συμβατά για τη νόσο και θετικά test σε αραιώση 1:32. Η ανίχνευση των αντισωμάτων δεν σημαίνει

απαραίτητα πρόσφατη λοίμωξη. Ένα ποσοστό των θετικών αντιδράσεων ίσως αντανακλά τον επιπολασμό της ασυμπτωματικής τοξοκαρίασης στον πληθυσμό.²⁶

Ο σημαντικότερος παράγοντας για αξιόπιστο αποτέλεσμα είναι η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου και εμπορικού συσκευασμένου αντιδραστήριου. Αυτό δεν είναι εύκολο λόγω της πληθώρας των αντιδραστηρίων που κυκλοφορούν. Στα προαπαιτούμενα είναι η μέθοδος να έχει την ικανότητα να διαγνώσει τη νόσο όταν υπάρχει (ευαισθησία) και να δίνει αρνητικό αποτέλεσμα στους υγιείς (ειδικότητα). Η αποτελεσματικότητα και η διαγνωστική αξία των μεθόδων είναι ανάλογοι της ευαισθησίας και της ειδικότητάς τους. Γενικά, μέθοδος με αποτελεσματικότητα και διαγνωστική αξία <80% είναι διαγνωστικά ασύμφορη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carponter BA. Immunoassays for the Diagnosis of Infectious Diseases In: Murray P. (editor-in-chief). Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 257-270.
2. Gouriet F, Drancourt M, Rault D. Multiplex Serology in Atypical Bacterial Pneumonia Ann NY Acad Sci 2006; 1078: 530-540.
3. Talkington D, Waites K. Mycoplasma pneumoniae and its Role as a Human Pathogen. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 697-728.
4. Mycoplasmas and Ureaplasmas. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Balimore: Lippincott William Wilkins; 2006 p. 1022-1063.
5. Baum GS. Mycoplasma Infection: Immunologic and Molecular Biologic Diagnostic Techniques. In: Rose N, Hamilton R, Detrick B (editors) Manual of Clinical Laboratory Immunology 6th ed. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 516-521.
6. Petitjean J, Varbet A, Guarin S, Freymuth F. Evaluation of four commercial immunoglobulin G (IgG) and IgM – specific enzyme immunoassays for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections. J Clin Microbiol 2002; 40:165-171.
7. Baum GS. Mycoplasma pneumoniae and Atypical Pneumonia. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Philadelphia, USA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2271-2280.
8. Waites K, Taylor – Robinson D. Mycoplasma and Ureaplasma. In: Murray P. (editor in chief). Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1004-1020.
9. Schachter J. Chlamydiae In: Rose N, Hamilton R, Detrick B (editors) Manual of Clinical Laboratory Immunology 6th ed. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 522-527.
10. Schlossberg D. Chlamydomydia (Chlamydia) psittaci (Psittacosis). In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Philadelphia, USA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2255-2258.
11. Essig A. Chlamydia and Chlamydomydia. In: Murray P. (editor in chief). Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1021-1035.
12. Kumar S, Hammerschlag M. Acute respiratory infection due to *Chlamydia Pneumoniae*: current status of diagnostic methods. Clin Infect Dis 2007; 44: 568-576.
13. Dowell S, Peeling R, Boman J, Carlone G, Fields B, Guarner J. et al Standardizing *Chlamydia Pneumoniae* assays: Recommendations from Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). CID 2001; 33: 492-503.
14. Edelstein P. Legionella. In: Murray P. (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 835-849.
15. Edelstein P. Detection of Antibodies to Legionella spp. In: Rose N, Hamilton R, Detrick B (editors) Manual of Clinical Laboratory Immunology 6th ed. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 468-476.

16. Brouqui P, Marrie J., Rault D. Coxiella. In Murray P (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed ASM Press Washington DC 2007, p. 1062-1069.
17. Loeffelholz M., Sanden C. Bordetella. In: Murray P. (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 803-814.
18. Lindquist D., Chu M., Probert W. Francisella and Brucella. In: Murray P. (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 815-834.
19. Treanor J. Influenza virus. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Philadelphia, USA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2060-2085.
20. Petric M., Comanor L., Petti C. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis 2006; 194(Suppl 2): S98-S109.
21. Hall Breese C., McCarthy C. Respiratory syncytial virus. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Philadelphia, USA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2008-2026.
22. Leland D. Parainfluenza and Mumps viruses. In: Murray P. (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1352-1360.
23. Robinson C, Echavarria M. Adenoviruses. In: Murray P. (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1589-1600.
24. Mahony J. Coronaviruses. In: Murray P. (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1414-1423.
25. Hess R. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. J Clin Microbiol 2004; 42: 3381-3387.
26. Wilson M, Schantz P., Nutman T., Tsang V. Clinical Immunoparasitology. In: Rose N, Hamilton R, Detrick B (editors). Manual of Clinical Laboratory Immunology 6th ed. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 547-558.

Συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα

Α. Κουτσοκέρα, Κ. Κωστίκας, Σ. Λουκίδης

Η αξιολόγηση της φλεγμονής των αεραγωγών και η περιγραφή των υποκείμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν νοσήματα του αναπνευστικού συστήματος μέσω αυτής, αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, τόσο στους ενήλικους όσο και στα παιδιά. Τα συμπτώματα και ο λειτουργικός έλεγχος του αναπνευστικού συστήματος χαρακτηρίζονται από περιορισμένη ευαισθησία όσον αφορά στον προσδιορισμό της φλεγμονής των αεραγωγών. Επίσης, οι κλασικές μέθοδοι δειγματοληψίας του κατώτερου αναπνευστικού, όπως το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και οι ενδοβρογχικές βιοψίες είναι μέθοδοι επεμβατικές, δύσκολα επαναλήψιμες, ενώ και οι ίδιες μπορεί να προάγουν φλεγμονώδεις διεργασίες σε πολλές περιπτώσεις. Μια ημι-επεμβατική τεχνική, η προκλητή απόχρεμψη, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αλλά απαιτεί εξειδικευμένο εργαστήριο, είναι χρονοβόρα και επίπονη για τον ασθενή και δεν μπορεί να επαναληφθεί πολύ συχνά. Αυτοί οι περιορισμοί των προηγούμενων τεχνικών, που στους παιδιατρικούς ασθενείς γίνονται ακόμη πιο προβληματικοί, οδήγησαν στην αναζήτηση μη επεμβατικών μεθόδων αξιολόγησης της φλεγμονής, όπως είναι η αξιολόγηση πτητικών ουσιών στον εκπνεόμενο αέρα, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), και οι υδρογονάνθρακες, αλλά και η συλλογή και ανάλυση του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα (exhaled breath condensate, EBC).

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική, που μπορεί εύκολα και μη επεμβατικά να συλλέξει μεγάλη ποικιλία, πτητικών και μη πτητικών, βιολογικών δεικτών από το αναπνευστικό σύστημα. Ήδη, από τα μέσα της δεκαετίας του '80, διαφάνηκαν οι δυνατότητες της μεθόδου και κατά τα επόμενα έτη αυξήθηκε ραγδαία ο αριθμός των ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε διάφορες παθήσεις του αναπνευστικού. Σήμερα, οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται κυρίως στον προσδιορισμό τιμών αναφοράς και επίλυσης μεθοδολογικών ζητημάτων, καθώς επιχειρείται η μετάβαση της μεθόδου από το ερευνητικό πεδίο στην κλινική πράξη.¹

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο εκπνεόμενος αέρας είναι κορεσμένος σε υδρατμούς, οι οποίοι αποτελούν και το βασικό συστατικό του. Κατά την εκπνοή, η στροβιλώδης ροή του αέρα επιτρέπει στους υδρατμούς να συμπαρασύρουν πολλά πτητικά και μη πτητικά μόρια που προέρχονται από ολόκληρη την αναπνευστική οδό, από το στόμα έως τις κυψελίδες. Η τεχνητή ψύξη του εκπνεόμενου αέρα προκαλεί υγροποίηση των υδρατμών και των ουσιών που αυτοί

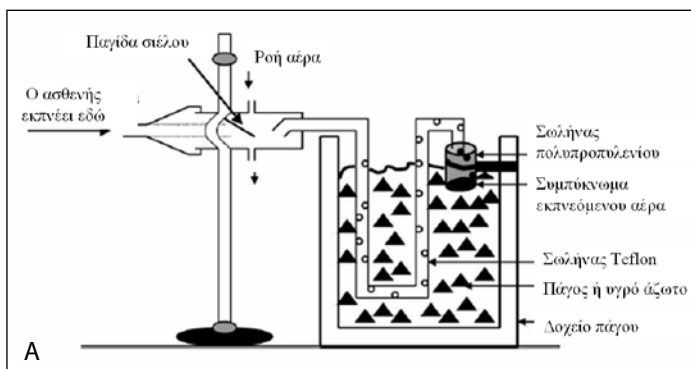
συμπαράσφουρουν, καθιστώντας εφικτή τη λήψη δείγματος EBC. Ο μηχανισμός με τον οποίο παράγεται αυτό το δείγμα δεν είναι απολύτως κατανοητός, αλλά θεωρείται ότι μεταβολές στη σύσταση του EBC αντανakλούν μεταβολές του υγρού που επαλείφει τους αεραγωγούς (airway lining fluid).

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα λαμβάνεται ψύχοντας τον εκπνεόμενο αέρα και η διαδικασία συλλογής είναι απολύτως μη επεμβατική. Ο εξεταζόμενος αρχικά ξεπλένει το στόμα και το στοματοφάρυγγά του με νερό και στη συνέχεια αναπνέει ήρεμα με σταθερό ρυθμό (tidal breathing) μέσω ενός επιστομίου για 10-15 min, ενώ η μύτη είναι κλειστή με ρινικό πίεστρο. Στο επιστόμιο υπάρχει βαλβίδα διπλής κατεύθυνσης, για το διαχωρισμό της εισπνοής από την εκπνοή, ενώ ιδανικά η συσκευή διαθέτει και παγίδα σιέλου. Ο εκπνεόμενος αέρας οδηγείται μέσω βαλβίδων μονής κατεύθυνσης στο εσωτερικό της διάταξης, όπου επιτυγχάνεται η ψύξη του και συλλέγεται σε υγρή ή στερεή μορφή, ανάλογα με το είδος της συσκευής και την ελάχιστη θερμοκρασία που αυτή επιτυγχάνει. Στη συνέχεια το δείγμα αποθηκεύεται στους -70°C και ακολουθεί η περαιτέρω επεξεργασία και η βιοχημική ανάλυσή του για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων βιολογικών δεικτών.

Συστήματα συλλογής

Υπάρχουν πολλά είδη συσκευών, κάποιες από τις οποίες είναι αυτοσχέδιες και κάποιες εμπορικά διαθέσιμες (Εικόνες 1, 2 και 3). Στη συνέχεια περιγράφονται ορισμένες από τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες διατάξεις, παραλλαγές των οποίων μπορούν να εφαρμοστούν και σε ασθενείς υπό μηχανικό αερισμό.

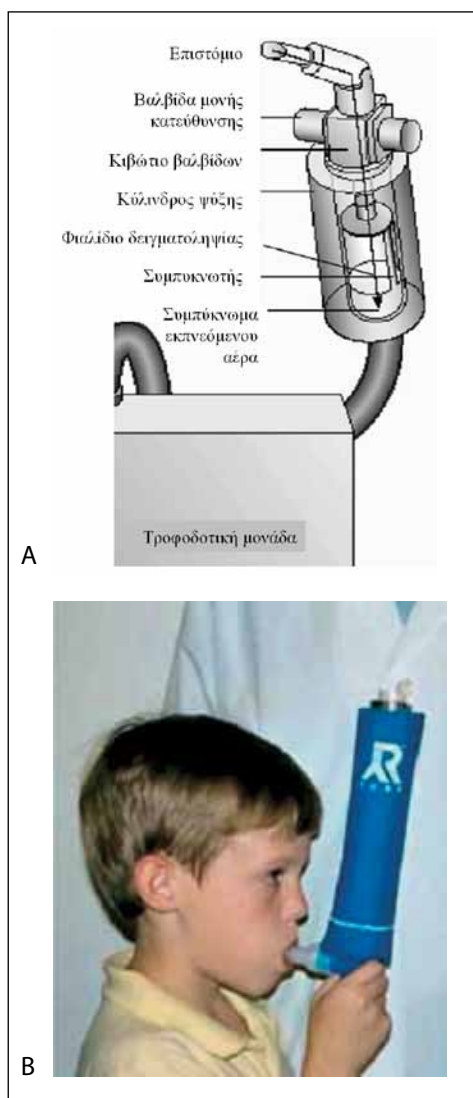


Εικόνα 1. Δομή αυτοσχέδιων συσκευών συλλογής συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα.

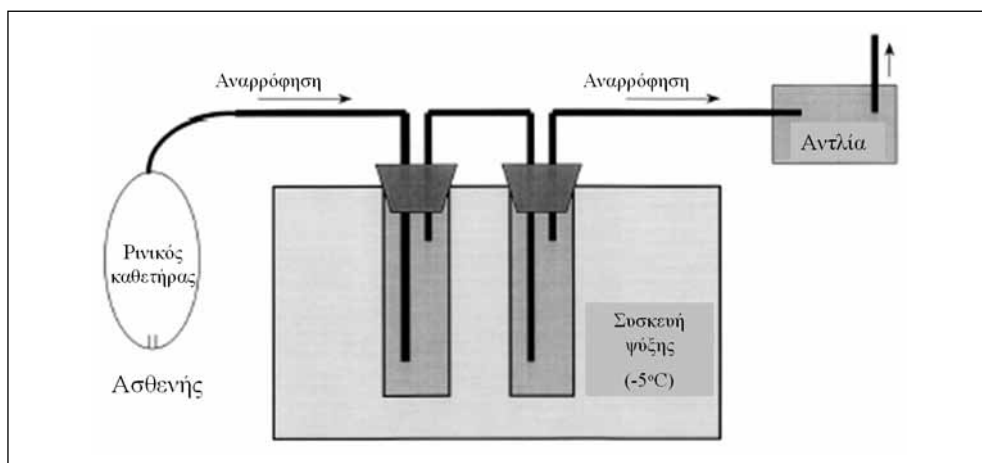
α) Διάταξη με σωλήνα από Teflon, ο οποίος είναι βυθισμένος σε δοχείο με πάγο (προσαρμοσμένη από Rahman et al.²⁴).

β) Σωλήνας διπλού αυλού με ψύξη με ψυχρό αέρα.²⁵

- **Συστήματα που χρησιμοποιούν ψύξη με πάγο:** ο εξεταζόμενος αναπνέει στο επιστόμιο και ο εκπνεόμενος αέρας οδηγείται, με τη βοήθεια βαλβίδων μονής κατεύθυνσης, στο εσωτερικό ενός σωλήνα που είναι βυθισμένος σε πάγο ή σε ένα σύστημα δοχείων που ψύχονται με πάγο. Το δείγμα συλλέγεται στο άλλο άκρο του σωλήνα ή μέσα στα κατάλληλα δοχεία (Εικόνα 1α).
- **Συστήματα που χρησιμοποιούν ψύξη με ψυχρό αέρα:** ο εξεταζόμενος αναπνέει σε σωλήνα διπλού αυλού. Ψυχρός αέρας διέρχεται από τον εξωτερικό σωλήνα, ενώ ο εσωτερικός ψύχεται από τον ψυχρό αέρα και το δείγμα συλλέγεται στο περιφερικό άκρο αυτού του σωλήνα (Εικόνα 1β).
- **Φορητά συστήματα (RTube, Respiratory Research Inc. USA):** αποτελούνται από έναν επαναχρησιμοποιούμενο κύλινδρο αλουμινίου, με κενό στο εσωτερικό του, ο οποίος ψύχεται και τοποθετείται στην εξωτερική επιφάνεια σωλήνα μίας χρήσης από πολυπροπυλένιο. Ο σωλήνας πολυπροπυλενίου διαθέτει δύο βαλβίδες μονής κατεύθυνσης και ένα επιστόμιο, έτσι ώστε να συγκεντρώνει το δείγμα στο εσωτερικό του (Εικόνα 2α).
- **Συστήματα ηλεκτρικής ψύξης (EcoScreen™, Jaeger):** επιτρέπουν τη συλλογή 1-2 ml δείγματος σε σταθερή θερμοκρασία -20°C εντός 10 λεπτών. Μπορεί επίσης να συνδεθεί σπιρόμετρο, το οποίο καταγράφει τον όγκο και τη ροή του εκπνεόμενου αέρα (Εικόνα 2β).
- Σε παιδιατρικούς ασθενείς που αδυνατούν να συνεργαστούν λόγω μικρής ηλικίας, έχει εφαρμοστεί και η τεχνική ρινικής συλλογής.² Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται ρινικός καθετήρας, ο οποίος συνδέεται με σωλήνες πολυπροπυλενίου βυθισμένους σε πάγο και στη συνέχεια με αναρρόφηση (Εικόνα 3). Αυτή η διαδικασία επιτρέπει απομόνωση μικρού ποσοστού των εκπνεόμενων υδρατμών, ενώ είναι δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων της με αυτά που προκύπτουν από τις κλασικές τεχνικές συλλογής. Οι αρχικά χρησιμοποιούμενες διατάξεις παρουσίαζαν ορισμένα μειονεκτήματα, τα



Εικόνα 2. Δομή εμπορικά διαθέσιμων συσκευών συλλογής συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα (προσαρμοσμένη από Montuschi²⁶). α) Συσκευή ηλεκτρικής ψύξης (EcoScreen™, Jaeger). β) Φορητή διάταξη (RTube, Respiratory Research Inc. USA).



Εικόνα 3. Διάταξη που χρησιμοποιείται για ρινική συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα σε παιδιατρικούς ασθενείς (προσαρμοσμένη από Griese et al.²).

οποία ξεπεράστηκαν με τη χρήση των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων. Βασικό πρόβλημα στις αρχικές μελέτες, αποτέλεσε η επιμόλυνση με σίελο, η οποία καθιστούσε αναγκαίο τον προσδιορισμό αμυλάσης στο δείγμα. Σήμερα συστήνεται η χρήση παγίδας σιέλου, ενώ δεν κρίνεται αναγκαίος ο προσδιορισμός των επιπέδων αμυλάσης στο δείγμα. Επιπρόσθετα με τις αυτοσχέδιες διατάξεις, η θερμοκρασία ψύξης του δείγματος δεν ήταν σταθερή, καθώς με το πέρασμα του χρόνου η σταδιακή τήξη του πάγου προκαλούσε μεταβολή τη θερμοκρασίας. Οι πιο σύγχρονες συσκευές και ιδιαίτερα οι εμπορικά διαθέσιμες έχουν υπερκεράσει σε μεγάλο βαθμό το πρόβλημα.

Σημεία κλειδιά και συστάσεις

Μεθοδολογικά ζητήματα που αφορούν στη συλλογή του EBC αποτελούν αντικείμενο συζήτησης στην επιστημονική κοινότητα και πρόσφατα οδήγησαν στη διατύπωση κατευθυντήριων οδηγιών (ATS/ERS Task Force).¹ Οι βασικές συστάσεις είναι οι ακόλουθες:

- Η συλλογή δείγματος να πραγματοποιείται σε ήρεμη και σταθερή αναπνοή (tidal breathing) από το στόμα, με τον εξεταζόμενο σε καθιστή θέση.
- Να χρησιμοποιείται ρινικό πίεστρο (nose clip).
- Να χρησιμοποιείται επιστόμιο με βαλβίδα διαχωρισμού εισπνοής και εκπνοής. Η βαλβίδα του επιστομίου να έχει χαμηλή αντίσταση.
- Να χρησιμοποιείται παγίδα σιέλου.
- Να μη χρησιμοποιείται φίλτρο μεταξύ του εξεταζόμενου και της διάταξης.
- Η επιφάνεια συλλογής δείγματος να είναι κατασκευασμένη από αδρανές υλικό.
- Η θερμοκρασία ψύξης και ο χρόνος συλλογής να καταγράφονται και να διατηρούνται σταθερά κατά τη διεξαγωγή μίας μελέτης.
- Κατά τη δημοσίευση μίας εργασίας να περιγράφεται αναλυτικά η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε.

Ο Πίνακας 1 περιέχει αναλυτική λίστα των παραμέτρων που ιδανικά πρέπει να καταγράφονται κατά τη συλλογή EBC.³

Πίνακας 1: Παράμετροι που ιδανικά πρέπει να καταγράφονται κατά τη συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα. Προσαρμοσμένος από Rosías et al.³

Συμπυκνωτής

Σύστημα
Υλικό επένδυσης συστήματος
Θερμοκρασία ψύξης

Ασθενής

Ηλικία
Φύλο
Βάρος
Ύψος
Νόσος (καπνιστική συνήθεια/ λοιμώξεις ανώτερου αναπνευστικού)
Φαρμακευτική αγωγή
Πρότυπο αναπνοής (ήρεμη αναπνοή/ δυναμική εκπνοή)
Αναπνευστικές παράμετροι (συχνότητα, κατά λεπτό αερισμός, ολικός εκπνεόμενος όγκος)
Ροή
Θερμοκρασία αναπνοής
Παράμετροι αναπνευστικής λειτουργίας
Ρινοπίεστρο (nose clip) - μάσκα προσώπου
Επιμόλυνση δείγματος με πτύελα (παγίδα, πλύσεις στόματος, κατάποση)

Περιβάλλον

Θερμοκρασία
Όζον
Υγρασία

Συλλογή

Ημερομηνία/ώρα
Μορφή δείγματος (στερεή/υγρή)
Διάρκεια
Ανεπιθύμητες ενέργειες
Όγκος συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα

Συντήρηση δειγμάτων

Όγκος σε κρυοφιαλίδιο
Αριθμός δειγμάτων
Προσθήκη αντιδραστηρίων
Θερμοκρασία αποθήκευσης
Διάρκεια αποθήκευσης

Ανάλυση δειγμάτων

Ημερομηνία
Μέθοδος
Όρια ανίχνευσης

Ανίχνευση βιολογικών δεικτών στο EBC

Στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα έχει ανιχνευθεί πληθώρα ουσιών, ενώ στη λίστα των βιολογικών δεικτών που έχουν προσδιορισθεί προστίθενται ολοένα και περισσότεροι. Κατά την παρούσα φάση, οι ερευνητικές προσπάθειες δεν εστιάζονται μόνο στην ανακάλυψη νέων βιολογικών δεικτών ή στον προσδιορισμό των ήδη γνωστών σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες, αλλά κυρίως στην επίλυση μεθοδολογικών ζητημάτων και στον καθορισμό τιμών αναφοράς. Ορισμένοι από τους δείκτες που έχουν μελετηθεί και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον περιγράφονται παρακάτω.^{1,3,4}

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Τα φλεγμονώδη κύτταρα των αεραγωγών παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μετατρέπονται στο λιγότερο δραστικό H_2O_2 . Το τελευταίο μπορεί να προσδιοριστεί στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα.

Ανίχνευση σε πάσχοντες ενήλικους: Τα επίπεδα του H_2O_2 έχουν προσδιορισθεί σε ασθενείς με άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), βρογχεκτασίες, κυστική ίνωση, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), πνευμονία, σαρκοείδωση, φυματίωση και συστηματική σκλήρυνση.¹

Ανίχνευση σε παιδιατρικούς ασθενείς: Εκτός από τον προσδιορισμό του σε αρκετά μεγάλο αριθμό υγιών παιδιών,⁵ το H_2O_2 έχει μετρηθεί σε παιδιά με άσθμα σε σταθερή κατάσταση και σε παρόξυνση, σε κυστική ίνωση και σε ασθενείς υπό μηχανικό αερισμό.³

Προϊόντα μεταβολισμού του NO

Το NO παράγεται από την L-αργινίνη μέσω του ενζύμου συνθετάση του NO (NOS) και αποτελεί έναν από τους πιο μελετημένους δείκτες φλεγμονής των αεραγωγών, κυρίως σε ασθενείς με άσθμα.⁶ Το NO συμπεριφέρεται ως ελεύθερη ρίζα και μπορεί να αντιδράσει με οξυγόνο ή ιόντα υπεροξειδίου και να

οδηγήσει στην παραγωγή ουσιών όπως νιτρώδη (NO_2^-), νιτρικά (NO_3^-) και υπεροξυνιτρώδη (peroxinitrates). Τα τελευταία είναι εξαιρετικά ασταθείς ουσίες και αντιδρούν με τυροσινικά τμήματα πρωτεϊνών ή με μεγαλομοριακές ενώσεις που περιέχουν θείο, παράγοντας νιτροτυροσίνη ή S-νιτροζοθειόλες αντίστοιχα.

Ανίχνευση σε πάσχοντες ενήλικους: Τα επίπεδα NO_2^- και NO_3^- έχουν προσδιορισθεί σε ασθενείς με άσθμα, ΧΑΠ, βρογχεκτασίες, κυστική ίνωση, οξεία πνευμονική βλάβη (acute lung injury), πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών και πνευμονία της κοινότητας. Η νιτροτυροσίνη έχει μελετηθεί σε ασθενείς με άσθμα και κυστική ίνωση, ενώ οι νιτροζοθειόλες σε βρογχικό άσθμα, ΧΑΠ και κυστική ίνωση.¹

Ανίχνευση σε παιδιατρικούς ασθενείς: Τα επίπεδα NO_2^- αξιολογήθηκαν σε παιδιά με άσθμα, κυστική ίνωση, πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών και επεισόδια βήχα, ενώ η νιτροτυροσίνη σε άσθμα και κυστική ίνωση.³

Προϊόντα μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος

Τα εικοσανοειδή αποτελούν μία ετερογενή οικογένεια ουσιών με 20 άτομα άνθρακα στο μόριό τους, που προκύπτουν από το αραχιδονικό οξύ, με την επίδραση ενζύμων ή οξειδωτικού στρες. Η δράση του ενζύμου κυκλοοξυγενάση οδηγεί σε παραγωγή προστανοειδών, τα οποία διακρίνονται σε προσταγλανδίνες (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) και θρομβοξάνες (η TXA_2 μετατρέπεται ταχέως σε TXB_2). Η επίδραση του ενζύμου 5-λιποξυγενάση στο αραχιδονικό οξύ οδηγεί στην παραγωγή λευκοτριενίων, τα οποία διακρίνονται στην LTB_4 και τα κυστεϊνυλικά λευκοτριένια (cys-LTs - LTC_4 , LTD_4 , LTE_4). Τέλος, με την επίδραση του οξειδωτικού στρες, το οποίο είναι ανεξάρτητο από ενζυμικά μονοπάτια, παράγεται το 8-epi-PGF_{2α}, γνωστό και ως 8-ισοπροστάνιο.⁷

Ανίχνευση σε πάσχοντες ενήλικες: Η PGE_2 έχει προσδιορισθεί σε ασθενείς με άσθμα και ΧΑΠ, ενώ η TXB_2 σε αλλεργική ρινίτιδα και σε ασθενείς υπό μηχανικό αερισμό. Η LTB_4 αξιολογήθηκε σε άτομα με άσθμα, ΧΑΠ και κυστική ίνωση, ενώ τα cys-LTs έχουν μελετηθεί εκτενώς στο άσθμα. Το 8-ισοπροστάνιο αποτελεί έναν από τους πιο μελετημένους δείκτες, αφού έχει μετρηθεί σε ασθενείς με άσθμα, ΧΑΠ, ARDS, κυστική ίνωση, σύνδρομο αποφρακτικών απνοιών κατά τον ύπνο και σαρκοείδωση.^{1,4}

Ανίχνευση σε παιδιατρικούς ασθενείς: Η PGE_2 και η LTB_4 έχουν μελετηθεί σε παιδιά με άσθμα και πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών, τα cys-LTs σε άσθμα, κυστική ίνωση και πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών, ενώ το 8-ισοπροστάνιο έχει προσδιορισθεί σε ασθενείς με άσθμα, κυστική ίνωση, επεισόδια συριγμού και οξεία λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού.³

pH

Από μεθοδολογικής άποψης, το pH θεωρείται ότι αποτελεί την καλύτερα αξιολογημένη μέτρηση που πραγματοποιείται στο EBC. Η συνιστώμενη τεχνική προσδιορισμού του αφορά τη μέτρησή του αμέσως μετά τη συλλογή του δείγματος και μετά τη σταθεροποίησή του με αδρανές αέριο.

Ανίχνευση σε πάσχοντες ενήλικους: Η ενδογενής οξίνιση των αεραγωγών αξιολογήθηκε σε ασθενείς με άσθμα, ΧΑΠ, βρογχεκτασίες, κυστική ίνωση και ARDS.^{1,4}

Ανίχνευση σε παιδιατρικούς ασθενείς: Το pH του EBC μελετήθηκε σε άσθμα και σε κυστική ίνωση.³

Επιπρόσθετοι βιολογικοί δείκτες

Στο EBC έχουν επίσης προσδιοριστεί κυτταροκίνες, αδενοσίνη, αλδεΐδες, γλουταθειόνη, αμμωνία, αγγειοδραστικές αμίνες, ηλεκτρολύτες, DNA και συγκεκριμένες μεταλλάξεις, θειόλες, βιτρονεκτίνη, ενδοθελίνη-1, ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη, κερατίνη, προϊόντα θειοβαρβιτουρικού οξέος καθώς και ωσμοτικότητα, αγωγιμότητα και χημειοτακτική δραστηριότητα.¹

EBC σε παθολογικές καταστάσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το EBC έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων της πνευμονολογίας και της παιδιατρικής. Στη συνέχεια περιγράφονται ορισμένα από τα κυριότερα ευρήματα που αφορούν παθήσεις παιδιατρικών ασθενών.

Άσθμα

Τα επίπεδα του H_2O_2 , τόσο σε ενηλίκους^{8,9} όσο και σε παιδιά^{10,11} που πάσχουν από άσθμα και δεν λαμβάνουν εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή, είναι αυξημένα, ενώ οι ασθενείς με σταθερό άσθμα που λαμβάνουν εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή παρουσιάζουν τιμές παρόμοιες με αυτές των υγιών μαρτύρων. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν την παρουσία αυξημένου οξειδωτικού στρες στους αεραγωγούς ασθματικών ασθενών και αντικατοπτρίζουν το ρυθμιστικό ρόλο των κορτικοστεροειδών σε αυτό το κλινικό πλαίσιο. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, ένας ακόμη δείκτης οξειδωτικού στρες, το 8-ισοπροστάνιο, είναι επίσης αυξημένος σε ασθενείς με άσθμα και τα επίπεδά του επηρεάζονται από τον έλεγχο της νόσου.^{12,13} Εντούτοις, σε αυτή την περίπτωση, τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευτεί σχετικά με την επίδραση των κορτικοστεροειδών είναι αντικρουόμενα.

Τα προϊόντα μεταβολισμού του NO που ανιχνεύονται στο EBC, παρουσιάζουν επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη του άσθματος.^{13,14} Τα επίπεδα NO_2^-/NO_3^- , νιτροτυροσίνης και S-νιτροζοθειολών είναι αυξημένα σε ασθενείς με άσθμα και επηρεάζονται από τη λήψη κορτικοστεροειδών, ενώ και στα παιδιά οι τιμές NO_2^-/NO_3^- αντανακλούν τη βαρύτητα της νόσου.^{13,14} Τέλος, το pH αποτελεί πολλά υποσχόμενο δείκτη που έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του ελέγχου του άσθματος.¹⁴ Έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με σταθερό επίμονο άσθμα παρουσιάζουν χαμηλότερο pH συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, ενώ η τιμή του pH φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο από την εκδήλωση παροξύνσεων όσο και τη λήψη αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Σε μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη, ωστόσο, το pH του EBC δεν διέφερε μεταξύ παιδιών με και χωρίς συμπτώματα ενδεικτικά άσθματος, όπως αυτά αναφέρθηκαν από τους γονείς.¹⁵

Κυστική ίνωση

Σε ασθενείς με κυστική ίνωση υπό έλεγχο δεν διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα H_2O_2 , όμως κατά τη διάρκεια παροξύνσεων οι τιμές του H_2O_2 ήταν ιδιαίτερα αυξημένες και υποχωρούσαν μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ενώ το H_2O_2 είναι ακατάλληλος δείκτης για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών σε σταθερή κλινική κατάσταση, εντούτοις μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της θεραπείας κατά τη διάρκεια των παροξύνσεων.¹⁶ Επιπρόσθετα, σύμφωνα με μελέτες που επικεντρώθηκαν σε παιδιατρικούς ασθενείς με κυστική ίνωση, η νιτροτυροσίνη δεν φάνηκε να αποτελεί καλό δείκτη παρακολούθησης του οξειδωτικού στρες, ενώ τα νιτρώδη,

το pH και το 8-ισοπροστανίνο φαίνεται ότι αποτελούν χρήσιμους δείκτες αξιολόγησης της φλεγμονής των αεραγωγών.^{17,18}

Πρωτοπαθής δυσκινησία κροσσών

Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα εκπνεόμενου NO σε ασθενείς με πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών, ενώ στο EBC παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα μεταβολιτών του NO, όπως $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ και S-νιτροζοθειόλες, είναι παρόμοια με αυτά των υγιών ατόμων. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι το ένζυμο NOS θα μπορούσε να είναι δραστικό, έστω και σε μικρότερο βαθμό, σε αυτή την κατηγορία ασθενών.¹⁹ Επιπρόσθετα, στο ίδιο κλινικό πλαίσιο παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του 8-ισοπροστανίου, αλλά όχι του LTB_4 , ευρήματα ενδεικτικά της παρουσίας αυξημένου οξειδωτικού στρες στους αεραγωγούς αυτών των ασθενών.²⁰

Άλλες καταστάσεις

Το EBC έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της φλεγμονής των αεραγωγών σε παιδιά που υπέστησαν πνευμονική βλάβη λόγω έκθεσης σε χλώριο πισίνας και αποκάλυψε αυξημένα επίπεδα LTB_4 , που εξακολουθούσαν να είναι υψηλά για αρκετούς μήνες μετά την αρχική έκθεση.²¹ Σε άλλη μελέτη, επιχειρήθηκε η αξιολόγηση της επίδρασης του παθητικού καπνίσματος και δεν διαπιστώθηκε αύξηση της τιμής του H_2O_2 στο EBC σε παιδιά ηλικίας 9 ετών.²² Τέλος, σε παιδιατρικούς ασθενείς με ροχαλητό και διαταραχές αναπνοής κατά τον ύπνο βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα λευκοτριενίων (LTB_4 , cys-LTs) στο EBC που συλλέχθηκε από το ανώτερο αναπνευστικό και συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της διαταραχής, παρέχοντας πιθανό μη επεμβατικό δείκτη για την κλινική αξιολόγηση αυτών των παιδιών.²³

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (exhaled breath condensate, EBC) αποτελεί μη επεμβατική τεχνική, πολλά υποσχόμενη, που στοχεύει στην αξιολόγηση της φλεγμονής των αεραγωγών. Σε δείγματα EBC που λαμβάνονται μετά από ψύξη του εκπνεόμενου αέρα, έχει ανιχνευθεί μια πληθώρα ουσιών και στη λίστα των βιολογικών δεικτών που έχουν προσδιορισθεί προστίθενται ολοένα και περισσότερες ουσίες. Η εφαρμογή του στην παιδιατρική παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού έχει ήδη χρησιμοποιηθεί, μεταξύ άλλων, για την εκτίμηση της φλεγμονής των αεραγωγών στο άσθμα και την κυστική ίνωση. Σήμερα, οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται κυρίως στον προσδιορισμό τιμών αναφοράς και στην επίλυση μεθοδολογικών ζητημάτων. Με δεδομένα το μη επεμβατικό χαρακτήρα της και την ευκολία με την οποία μπορεί να εκτελεστεί και από παιδιατρικούς ασθενείς, αναμένεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μετάβαση της μεθόδου από το αμιγώς ερευνητικό πεδίο στην κλινική πράξη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523-548.
2. Griesse M, Latzin P, Beck J. A noninvasive method to collect nasally exhaled air condensate in humans of all ages. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 915-920.
3. Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, Heijmans JW, Donckerwolcke RA, Jobsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 4-19.
4. Koutsokera A, Loukides S, Gourgoulisanis KI, Kostikas K. Biomarkers in the exhaled breath condensate of healthy adults: mapping the path towards reference values. *Curr Med Chem* 2008; 15: 620-630.
5. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, Hop WC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 1998; 12: 483-485.
6. Kharitonov SA, Barnes PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Resp J* 2000; 16: 781-792.
7. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989; 259: 315-324.
8. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Panagou P, Siafakas NM. The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest* 2002; 121: 338-346.
9. Kostikas K, Koutsokera A, Papiris S, Gourgoulisanis KI, Loukides S. Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 557-565.
10. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J* 1997; 10: 519-521.
11. Corradi M, Zinelli C, Caffarelli C. Exhaled breath biomarkers in asthmatic children. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6: 150-159.
12. Baraldi E, Ghio L, Piovan V, Carraro S, Ciabattini G, Barnes PJ, et al. Increased exhaled 8-isopropane in childhood asthma. *Chest* 2003; 124: 25-31.
13. Robroeks CM, van de Kant KD, Jobsis Q, Hendriks HJ, van Gent R, Wouters EF, et al. Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1303-1311.
14. Ratnawati, Morton J, Henry RL, Thomas PS. Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 929-936.
15. Nicolaou NC, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Simpson A, Custovic A. Exhaled breath condensate pH and childhood asthma: unselected birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 254-259.
16. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, Kroesbergen A, Hop WC, de Jongste JC. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Eur Respir J* 2000; 16: 95-100.
17. Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004; 125: 2005-2010.
18. Cunningham S, McColm JR, Ho LP, Greening AP, Marshall TG. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000; 15: 955-957.
19. Csoma Z, Bush A, Wilson NM, Donnelly L, Balint B, Barnes PJ, et al. Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest* 2003; 124: 633-638.
20. Zihlif N, Paraskakis E, Tripoli C, Lex C, Bush A. Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 509-514.

21. Bonetto G, Corradi M, Carraro S, Zanconato S, Alinovi R, Folesani G, et al. Longitudinal monitoring of lung injury in children after acute chlorine exposure in a swimming pool. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 545-549.
22. Doniec Z, Nowak D, Tomalak W, Pisiewicz K, Kurzawa R. Passive smoking does not increase hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in exhaled breath condensate in 9-year-old healthy children. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 41-45.
23. Goldbart AD, Krishna J, Li RC, Serpero LD, Gozal D. Inflammatory mediators in exhaled breath condensate of children with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2006; 130: 143-148.
24. Rahman I, Kelly F. Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radic Res* 2003; 37: 1253-1266.
25. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1364-1370.
26. Montuschi P. Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta* 2005; 356: 22-34.

Εκπνεόμενο μονοξείδιο του αζώτου

Ε. Χατζηαγόρου, Ι. Τσανάκας

Η φλεγμονή των αεραγωγών παίζει βασικό ρόλο στις χρόνιες πνευμονοπάθειες, όπως στο άσθμα στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, στις βρογχεκτασίες, στο σύνδρομο δυσκινησίας των κροσσών και στην κυστική ίνωση (ΚΙ).^{1,2} Κατά καιρούς προτάθηκαν διάφοροι δείκτες για τον προσδιορισμό της. Το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια εστιάζεται στην ανακάλυψη νέων δεικτών φλεγμονής, που ο προσδιορισμός τους θα μπορούσε να γίνεται εύκολα, άμεσα και μη επεμβατικά. Ένας από αυτούς είναι το εκπνεόμενο μονοξείδιο του αζώτου (eNO). Η μέτρησή του αποτελεί μη επεμβατική μέθοδο προσδιορισμού της φλεγμονής των αεροφόρων οδών, ιδιαίτερα χρήσιμη τόσο στους ενηλίκους όσο και τα παιδιά.

ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

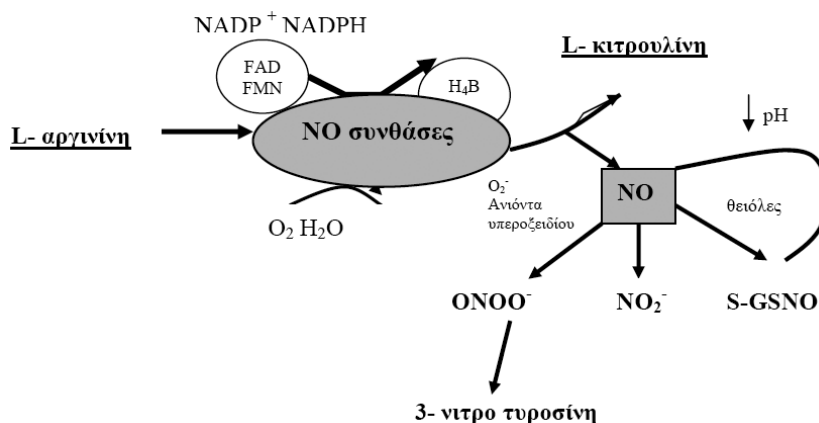
Σύνθεση μονοξειδίου αζώτου στους αεραγωγούς

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) αποτελεί σημαντικό ενδογενές ρυθμιστικό μόριο, που κατανέμεται σε όλο το ανθρώπινο σώμα. Λειτουργεί ως αγγειοφόρος σε πολλές διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες, όπως στη ρύθμιση της ροής του περιφερικού αίματος, την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσώρευσης, σε ανοσιακές αντιδράσεις, τη ρύθμιση της νευρομεταβίβασης, τη βρογχοδιαστολή και τη ρύθμιση της φλεγμονής.^{3,4}

Το NO σχηματίζεται από το Ν-γουανιδικό τερματικό άκρο του αμινοξέος L-αργινίνη, με τη δράση του ενζύμου συνθετάση του NO (NOS).^{5,6} Η επαγωγίμη μορφή του NOS (iNOS, NOSII), παράγεται στα μακροφάγα, επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα, μετά την επίδραση φλεγμονωδών κυτταροκινών ή ενδοτοξίνης και καταστρέφει τον επιτιθέμενο παράγοντα προκαλώντας παράλληλα απόπτωση των μακροφάγων (Εικόνα 1).^{7,8}

Το παραγόμενο NO διαχέεται διαμέσου της ενδοθηλιακής κυτταρικής μεμβράνης και πολύ σύντομα μετά την παραγωγή του οξειδώνεται σε νιτρώδεις (nitrite, NO₂⁻) και κατόπιν σε νιτρικές (Nitrate, NO₃⁻) ρίζες. Η ένωση του NO με τις ομάδες των θειολών σχηματίζει νιτροθειόλες, όπως η νιτροκυστεΐνη, η νιτροζολευκωματίνη και η νιτροζοαιμοσφαιρίνη. Η διέγερση της iNOS έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO, που οδηγεί σε βλάβη των ιστών.⁹ Αυτό οφείλεται στην αντίδραση του NO με τα ανιόντα υπεροξειδίου, τα οποία είναι άφθονα στις περιοχές που φλεγμαίνουν και δημιουργείται η υπεροξυνιτρώδης ρίζα, που αποτελεί ισχυρό κυτταροτοξικό οξειδωτή.¹⁰

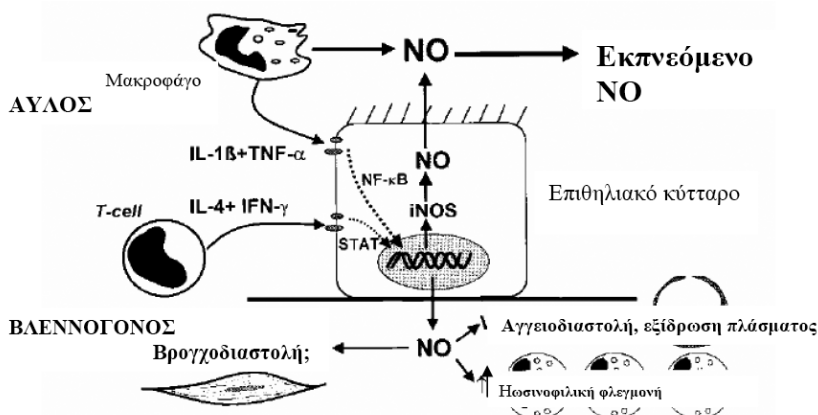
Επίσης, οι νιτροθειόλες μπορούν να παρέχουν μακράς διάρκειας αποτελέσματα μέσω



Εικόνα 1. Σύνθεση του NO και των διαφόρων προϊόντων του μεταβολισμού του.

της βραδείας απελευθέρωσης NO, δρώντας βρογχοδιασταλτικά, αντιμικροβιακά, στην κινητικότητα των κροσσών και την εφύγρανση των αεραγωγών.^{11,12} Έτσι, έχει βρεθεί ότι η αυξημένη παραγωγή του NO, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις επιτείνει την προκαλούμενη με οξειδωτικούς μηχανισμούς φλεγμονή των αεραγωγών, (μέσω της κυτταροτοξικής δράσης της υπεροξυνιτρικής ρίζας), μπορεί συγχρόνως να έχει προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στην κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τη φλεγμονή (Εικόνα 2).^{13,14}

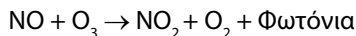
Η iNOS περιέχει συνδεδεμένο ασβέστιο και καλμοδουλίνη και δεν επηρεάζεται από τις συγκεντρώσεις ασβεστίου του γύρω χώρου όπου δρα, σε αντίθεση με τις δύο άλλες μορφές (ενδογενείς) της NOS.¹⁵ Είναι ενδιαφέρον ότι η δράση της iNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και στα μακροφάγα αναστέλλεται από τα κορτικοστεροειδή και αυτό πιθανώς αποτελεί περαιτέρω ερμηνεία της ευεργετικής φαρμακολογικής δράσης των τελευταίων.¹⁶



Εικόνα 2. Σύνθεση και δράσεις του εκπνεόμενου NO

Μέτρηση του eNO

Τα διάφορα συστήματα αναλυτών που χρησιμοποιούνται σήμερα για την μέτρηση του eNO βασίζονται στη μέθοδο της χημειοφωταύγας, μέσω αντίδρασης του NO με το όζον (O₃). Συγκεκριμένα, το NO του δείγματος εκπνεόμενου αέρα αντιδρά με O₃, σύμφωνα με την αντίδραση:



Τα παραγόμενα φωτόνια μετρώνται, μέσω της διαφοράς δυναμικού που δημιουργείται και είναι ανάλογη της ποσότητας του NO στο δείγμα αέρα.¹⁷

Ο προσδιορισμός του eNO στα παιδιά γίνεται με διάφορες μεθόδους και η επιλογή της καθεμιάς εξαρτάται από την ηλικία και τη δυνατότητα συνεργασίας του παιδιού.¹⁷ Η άμεση μέθοδος αφορά στον άμεσο υπολογισμό της συγκέντρωσης του eNO στον εκπνεόμενο αέρα, ενώ η έμμεση μέθοδος περιλαμβάνει τη συλλογή δείγματος του εκπνεόμενου αέρα σε κατάλληλο χώρο συλλογής και σε δεύτερο χρόνο μέτρηση της συγκέντρωσης του eNO στο αντίστοιχο δείγμα αέρα. Για τα μικρά ιδιαίτερα παιδιά, που δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν την τυποποιημένη μέθοδο άμεσης ή έμμεσης μονήρους εκπνοής, έχουν επινοηθεί εναλλακτικές μέθοδοι που περιγράφονται παρακάτω και δεν απαιτούν την ενεργό συνεργασία του εξεταζόμενου.

Πρόσφατα έχουν δημοσιευθεί Κατευθυντήριες Οδηγίες από την Ευρωπαϊκή και Αμερικάνικη Πνευμονολογική Εταιρεία για τη μέτρηση του eNO σε κάθε ηλικιακή ομάδα.¹⁸ Η κάθε μέθοδος αναφέρεται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

Μέθοδος άμεσης μονήρους εκπνοής (SBOL)

Η μέτρηση του eNO με τη μέθοδο της άμεσης μονήρους εκπνοής (single-breath-on-line, SBOL) αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για παιδιά που μπορούν να συνεργαστούν (ηλικία >4-5 ετών). Το παιδί κάθεται αναπαυτικά και αναπνέει ήρεμα για 5 min. Ο εισπνεόμενος αέρας περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις NO (<5 ppb). Κατόπιν το παιδί εισπνέει μέχρι την ολική ζωτική χωρητικότητα (TLC) και αμέσως εκπνέει με σταθερή ροή 50 mL/sec, μέχρι να επιτευχθούν σταθερές τιμές του eNO σε διάστημα τουλάχιστον 2 sec κατά τη διάρκεια εκπνοής διάρκειας τουλάχιστον 4 sec. Ο ασθενής, καθώς εκπνέει, αντιμετωπίζει μικρή αντίσταση, με αποτέλεσμα η πίεση του εκπνεόμενου αέρα να κυμαίνεται μεταξύ 5-20 cm H₂O. Με τον τρόπο

Πίνακας 1. Μέθοδοι μέτρησης του eNO στα παιδιά.

Μέθοδος	Μονήρης εκπνοή	Μονήρης εκπνοή με ελεγχόμενη ροή	Ελεγχόμενη ροή κατά τη διάρκεια αυτόματης αναπνοής	Μη ελεγχόμενη ροή κατά τη διάρκεια ήρεμης αναπνοής	Βίαια μονήρης εκπνοή	
Τύπος	Άμεση	Έμμεση	Άμεση	Άμεση	Έμμεση	Άμεση
Ηλικία (έτη)	5-16	+	+			
	2-5			+	+	
	<2				+	+

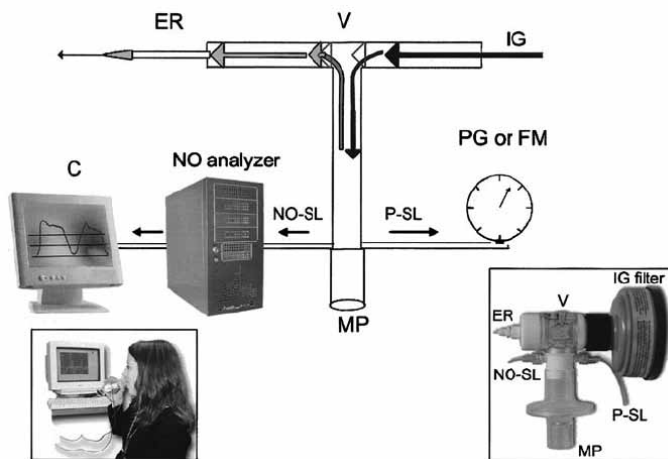
+ : Συνιστώμενη μέθοδος ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα.

* : Απαιτείται καταστολή. Τεχνική ταχείας θωρακο-κοιλιακής συμπίεσης.

Παράγοντες που επηρεάζουν το eNO

Καθορισμός φυσιολογικών τιμών NO στα παιδιά

Για τον καθορισμό των φυσιολογικών τιμών eNO στα Ελληνόπουλα μελετήθηκαν 454



C = Ηλεκτρονικός Υπολογιστής, ER = εκπνεόμενη αντίσταση, FM = μετρητής ροής, IG = Εισπνεόμενο αέριο, MP = Επιστόμιο, NO-SL = σωλήνας μέτρησης NO, PG = μέτρηση πίεσης, P-SL = σωλήνας μέτρησης πίεσης, V = βαλβίδα τριών εξόδων.

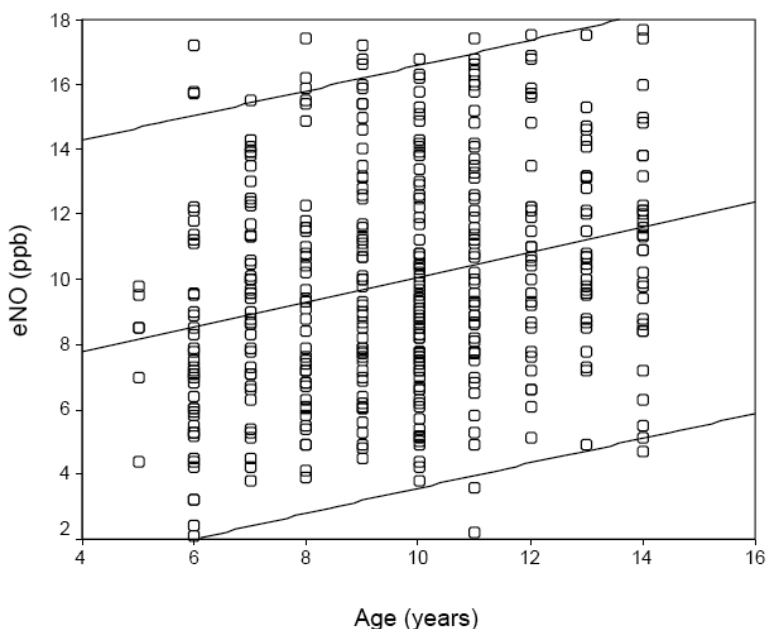
Πίνακας 2. Παράγοντες που επηρεάζουν τις μετρήσεις του eNO.

Αυξημένο eNO	Ελαττωμένο eNO
Δίαιτα πλούσια σε νιτρικά	Επανειλημμένες σπιρομετρήσεις
Μόλυνση περιβάλλοντος (NO , O_3)	Έντονη φυσική άσκηση
Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού	Βρογχόσπασμος
Επαγγελματικές συνήθειες	Πρόκληση πτυέλων
Χλωρίνη, σκόνη	Υποθερμία
Έκθεση σε οικιακή φορμαλδεΐδη	Κάπνισμα
	Κατανάλωση αλκοόλ

“υγιή παιδιά”, ηλικίας 6-14 ετών.²⁷ Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι για τα Ελληνόπουλα ηλικίας 6-14 ετών, ο μέση τιμή του eNO είναι 12,5 ppb, με τα ανώτερα φυσιολογικά όρια που εξαρτώνται από την ηλικία, να κυμαίνονται μεταξύ 11 ppb και 14 ppb (Εικόνα 4). Ως πιθανότερη ερμηνεία, θεωρείται η αύξηση του όγκου του πνεύμονα με την πάροδο του χρόνου, με συνεπακόλουθο την αύξηση της συνολικής επιφάνειας του αναπνευστικού επιθηλίου που παράγει το eNO. Άλλη πιθανή αιτία είναι η αύξηση της NOS η παραγωγή της οποίας συνατράται με την ηλικίας.^{28,29}

Άσθμα και eNO

Σε παθήσεις φλεγμονώδους αιτιολογίας, όπως το άσθμα, παρατηρούνται αυξημένες τιμές του eNO, λόγω αυξημένης παραγωγής της iNOS ως απάντηση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα,



Εικόνα 4. Τιμές του eNO στα υγιή παιδιά ανάλογα με την ηλικία (μέση τιμή±SD).

όπως οι κυτταροκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή.^{30,31} Η αυξημένη παραγωγή της iNOS στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών των ασθματικών ασθενών οφείλεται πιθανώς σε αυξημένη μεταγραφή μέσω παραγόντων μεταγραφής, όπως οι παράγοντες STAT-1 και ο μεταγραφικός παράγοντας πυρήνα NF-κΒ (nuclear factor-κΒ) καθώς και λόγω αυξημένης διάθεσης L-αργινίνης. Τα κορτικοστεροειδή αναστέλλουν την έκφραση της iNOS στα επιθηλιακά κύτταρα και ελαττώνουν το εκπνεόμενο NO σε ασθματικούς ασθενείς.³²

eNO και αποπία

Το eNO σχετίζεται με την ολική IgE, τις δερματικές δοκιμασίες νυγμού και την ηωσινοφιλία στο αίμα ασθματικών παιδιών.³³⁻³⁵ Κατά συνέπεια, στην κλινική πράξη κατά την αξιολόγηση του eNO στα ασθματικά παιδιά, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή συνύπαρξη αποπίας.³⁶

eNO και αναπνευστική λειτουργία

Μέχρι τώρα, η εκτίμηση της πορείας του άσθματος βασίζεται κυρίως στο ιστορικό (ασθματικά συμπτώματα) και τη μέτρηση της αναπνευστικής λειτουργίας (σπιρομέτρηση). Παρόλα αυτά, οι μεταβολές στην αναπνευστική λειτουργία δε σχετίζονται άμεσα με τη φλεγμονή, ενώ απαιτείται σημαντική μεταβολή του βαθμού της φλεγμονής για να μεταβληθεί η αναπνευστική λειτουργία.^{37,38} Επίσης, πολύ συχνά τα συμπτώματα δεν αντανakλούν το βαθμό της υποκείμενης φλεγμονής λόγω της συμμετοχής του υποκειμενικού παράγοντα.³⁹

Οι Stirling και συν.⁴⁰ σε μελέτη 52 ασθματικών ασθενών, έδειξαν ότι οι τιμές του eNO δε σχετίζονται με την αναπνευστική λειτουργία, ενώ παρόμοια ήταν τα ευρήματα των Langley και συν.⁴¹ που μελέτησαν 392 ασθματικά άτομα με ποικίλης βαρύτητας άσθμα. Φαίνεται λοιπόν, ότι η αναπνευστική λειτουργία δεν έχει την αναγκαία ευαισθησία για τη ανίχνευση της φλεγμονής των αεραγωγών, σε αντίθεση με το eNO.

Αντιασθματική αγωγή και eNO

Μελέτες έδειξαν ότι το eNO είναι αυξημένο στο άσθμα και ιδιαίτερα ευαίσθητο στα κορτικοστεροειδή.⁴² Έχει βρεθεί μείωση του NO μέσα σε 6 ώρες μετά μια μόνο δόση κορτικοστεροειδών χορηγούμενων με νεφελοποιητή, και 2-3 ημέρες μετά από εισπνοή αερολύματος, φθάνοντας στο μέγιστο αποτέλεσμα μετά από 2-4 εβδομάδες θεραπείας.⁴³ Πρόσφατες μελέτες σε ασθματικά παιδιά επιβεβαίωσαν ότι η μείωση του eNO από τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή είναι δοσο-εξαρτώμενη και η ανταπόκριση σε αυτά μπορεί να προβλεφθεί από τις τιμές του eNO.^{44,45}

Σε αντίθεση με τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή, τόσο οι βραχείας δράσης β₂-αγωνιστές, όσο και οι μακράς, δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του eNO, καθώς δεν έχουν αντιφλεγμονώδη δράση.^{46,47}

Οι Currie και συν.⁴⁸ εκτίμησαν την αντιφλεγμονώδη δράση του συνδυασμού φλουτικαζόνης με σαλμετερόλη, συγκριτικά με διπλάσια δόση φλουτικαζόνης σε ασθματικούς ενήλικους. Τόσο, η φλουτικαζόνη, όσο και ο συνδυασμός ελάττωσαν τα επίπεδα του eNO. Εντούτοις, η ελάττωση του eNO ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα που έλαβε διπλάσια δόση κορτικοστεροειδούς, συγκριτικά με συνδυασμό.

Οι Whelan και συν.⁴⁹ έδειξαν ότι η μοντελουκάστη δεν επηρεάζει τις τιμές του eNO ασθματικών ατόμων. Εντούτοις, όταν ξεχώρισε τους ασθενείς ανάλογα με τον πολυμορφισμό

του γονότυπου της συνθάσης των λευκοτριενίων (LTC_4 -συνθετάση C4 των λευκοτριενίων A-444 C) η μοντελουκάστη ελάττωσε τις τιμές του eNO στην ομάδα των ετεροζυγωτών, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ομάδα των ασθενών ανταποκρίνεται καλύτερα στη θεραπεία με αντιλευκοτριένια.

Άλλες παθήσεις αναπνευστικού

Παρά την έντονη ουδετεροφιλική φλεγμονή των αεραγωγών στα παιδιά με ΚΙ, τα επίπεδα του eNO είναι ελαττωμένα, συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα. Πολλές θεωρίες προσπαθούν να εξηγήσουν το εύρημα. Οι Grasemann και συν.⁵⁰ απέδωσαν τα ελαττωμένα επίπεδα eNO στους ασθενείς με ΚΙ σε μειωμένη διάχυση του παραγομένου NO λόγω της παχύρρευστης βλέννης, ή λόγω οξείδωσής του σε νιτρικά ιόντα μέσω των παχύρρευστων εκκρίσεων των αεραγωγών.⁵¹ Άλλοι θεωρούν ότι οφείλονται σε ανεπάρκεια της iNOS.⁵²

Στην πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών, τα επίπεδα του eNO είναι χαμηλότερα από το φυσιολογικό, ενώ οι τιμές του ρινικού NO (nNO) είναι ιδιαίτερα χαμηλές και διαφοροποιούνται μεταξύ υγιών και ασθενών.⁵³ Η διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα του nNO στην πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών κυμαίνεται μεταξύ 89-100% και 97-100%, αντίστοιχα.⁵⁴ Οι χαμηλές τιμές του nNO αποδίδονται σε πιθανή μειωμένη δραστηριότητα της iNOS.⁵⁵

Κλινικές εφαρμογές του eNO

Διάγνωση άσθματος

Τα επίπεδα του eNO είναι αυξημένα σε ασθενείς με άσθμα.⁴² Τα αυξημένα επίπεδα του eNO προέρχονται κυρίως από το κατώτερο αναπνευστικό και οφείλονται στην ενεργοποίηση της ισομορφής iNOS στο επιθήλιο των αεραγωγών και τα κύτταρα της φλεγμονής.⁵⁶ Αυξημένες τιμές eNO δεν είναι ειδικές για τη διάγνωση του άσθματος, αλλά βοηθούν στη διαφορική διάγνωση της νόσου από άλλες παθήσεις που εκδηλώνονται με παρόμοια συμπτωματολογία.⁵⁷ Οι Dupont και συν.⁵⁸ σε μελέτη τους σε ενήλικους θεωρούν ότι τιμές eNO μεγαλύτερες από 16 ppb έχουν 90% ειδικότητα και 90% θετική προγνωστική αξία στη διάγνωση του άσθματος. Στη μελέτη αυτή, η διάγνωση του άσθματος τέθηκε με τη θετική δοκιμασία αντιστρεπτότητας και την βρογχική υπεραπαντητικότητα που εκτιμήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη. Αν το όριο αυτό μειωθεί στα 12 ppb η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου ελαττώνονται στο 81% και 80%, αντίστοιχα. Παρόμοιες μελέτες σε παιδιά είναι ελάχιστες. Οι Warke και συν.⁵⁹ έδειξαν ότι τιμές eNO μεγαλύτερες από 17 ppb είχαν μεγάλη ευαισθησία (81%) και ειδικότητα (80%) για την πρόβλεψη της φλεγμονής των αεραγωγών. Η φλεγμονή των αεραγωγών εκτιμήθηκε από το ποσοστό των ηωσινοφίλων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα.

Προγνωστική σημασία NO στον ασθματικό παροξυσμό

Οι πιο πρόσφατες μελέτες σχετικά με το eNO επικεντρώνονται στη συμβολή των επανειλημμένων μετρήσεων του eNO στην πρόβλεψη των ασθματικών παροξυσμών, κατά την ελάττωση ή διακοπή της αντι-ασθματικής αγωγής, καθώς και στο ρόλο της τακτικής μέτρησης του eNO για τη ρύθμιση της δόσης των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, ώστε να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος του άσθματος με την ελάχιστη δόση. Οι Smith και συν.⁶⁰ έδειξαν ότι μετρώντας τακτικά το eNO πέτυχαν μείωση της δόσης των

εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών κατά 40%, διατηρώντας παράλληλα ικανοποιητικό έλεγχο των συμπτωμάτων και θεωρώντας ως όριο μεταβολής της θεραπευτικής αγωγής την τιμή των 35 ppb. Οι Zacharasiewicz και συν.⁶¹ έδειξαν ότι η τακτική παρακολούθηση της φλεγμονής των αεραγωγών με μέτρηση του eNO βοηθά στην καλύτερη ρύθμιση της ελάχιστης αποτελεσματικής θεραπευτικής δόσης, καθώς υψηλές τιμές του eNO (≥ 22 ppb) αποτελούν σημαντικό προγνωστικό δείκτη ασθματικού παροξυσμού έξαρσης. Αντίθετα, στη μελέτη των Pijnenburg και συν.⁶² φάνηκε ότι επανειλημμένες μετρήσεις του eNO δε συνέβαλαν στη μείωση της δόσης των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, συνέβαλαν όμως στη μείωση της βρογχικής υπεραπαντητικότητας και του αριθμού των ασθματικών παροξυσμών.

Επίσης, η μελέτη των Fritch και συν.⁶³ έδειξε ότι η ρύθμιση της δόσης των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, βασιζόμενη στην τακτική μέτρηση του eNO, δε συνέβαλε σε καλύτερη ρύθμιση του άσθματος, όπως αυτή εκφράζεται με την αναπνευστική λειτουργία.

Σε μελέτη των συγγραφέων αυτού του κεφαλαίου διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του eNO, ένα μήνα μετά τη διακοπή των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών, προέβλεπε την υποτροπή του άσθματος στο επόμενο δίμηνο ($p=0,003$). Από τις καμπύλες ROC φαίνεται ότι συγκέντρωση eNO ίση με 39,5 ppb, ένα μήνα μετά τη διακοπή των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών συνδύαζε τη βέλτιστη ευαισθησία και ειδικότητα για την πρόβλεψη υποτροπής το επόμενο δίμηνο (ευαισθησία 75,0%, ειδικότητα 94,7%). Αντίθετα, η αναπνευστική λειτουργία (FVC, FEV₁) δεν μπορούσε να προβλέψει τη μελλοντική υποτροπή της νόσου.⁶⁴ Παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι Pijnenburg και συν.⁶⁵ που έδειξαν ότι αυξημένες τιμές του eNO στις δύο και στις τέσσερις εβδομάδες μετά τη διακοπή των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών σε ασυμπτωματικά ασθματικά παιδιά μπορούν να αποτελούν αντικειμενικό προγνωστικό δείκτη πρόβλεψης του ασθματικού παροξυσμού.

Γενικά φαίνεται, το eNO πλεονεκτεί έναντι των κλασσικών μεθόδων αναγνώρισης και παρακολούθησης των ασθματικών παιδιών, ανίχνευσης της αποπίας, και εκτίμησης της επαρκούς δόσης αντιφλεγμονώδους αντι-ασθματικής αγωγής. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα όμως της μέτρησης του eNO στα ασθματικά παιδιά είναι η βοήθεια που μπορεί να προσφέρει κατά την ελάττωση ή διακοπή της αντιφλεγμονώδους αγωγής, καθώς προβλέπει την ασθματική υποτροπή.^{66,67}

Αξιολόγηση τιμών eNO σε παιδιατρικούς ασθενείς

Με βάση τα δεδομένα της τρέχουσας βιβλιογραφίας, έχει διαμορφωθεί ένας αλγόριθμος εκτίμησης των τιμών του eNO στην παιδιατρική πράξη (Πίνακας 3).⁶⁸

Συμπεράσματα

Ο προσδιορισμός του eNO, αποτελεί εναλλακτική μέθοδο ελέγχου και παρακολούθησης της φλεγμονής των αεραγωγών σε παιδιά με άσθμα. Είναι πολύ χρήσιμος για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χορηγούμενης αγωγής, την τροποποίηση της δόσης των χορηγούμενων φαρμάκων και για την πρόβλεψη πιθανής μελλοντικής έξαρσης των συμπτωμάτων. Έτσι μπορεί να δικαιολογηθεί και ο διεθνής χαρακτηρισμός του ως συσκευής μέτρησης της ασθματικής φλεγμονής ("asthma inflammometer"). Δε βοηθά στην εκτίμηση της φλεγμονής άλλων χρόνιων πνευμονοπαθειών της παιδικής ηλικίας, ενώ μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση από το άσθμα. Πλεονεκτήματα της μεθόδου θεωρούνται, η πρακτικότητα (μη-επεμβατική μέθοδος, άμεση λήψη αποτελέσματος) και

Πίνακας 3. Αλγόριθμος χρήσης των τιμών του eNO σε ασθματικά παιδιά.

Τιμές eNO (ppb)	Ηωσινο-φιλική φλεγμονή	Εκτίμηση	
		Παιδιά χωρίς αγωγή με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή	Παιδιά που λαμβάνουν εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή
<5 (χαμηλές τιμές)	Όχι	• Πρωτοπαθής δυσκινησία κροσσών • Κυστική ίνωση	
5-25 (φυσιολογικές τιμές)	Όχι	• Γαστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση • Ουδετεροφιλικό άσθμα • Συγγενείς ανωμαλίες • Ανοσοανεπάρκειες • Δυσλειτουργία φωνητικών χορδών	Αν το παιδί είναι συμπτωματικό: Αναθεωρείστε τη διάγνωση του άσθματος Αν το παιδί δεν έχει συμπτώματα: Καλή συμμόρφωση στη φαρμακευτική αγωγή. Ελαττώστε τη δόση των φαρμάκων, ή διακόψτε τη ρυθμιστική αγωγή
25-35 (μέτρια αυξημένες)	Ήπια	• Σκεφτείτε τη χορήγηση εισπνεομένων κορτικοστεροειδών • Πιθανότητα ιογενούς λοίμωξης του αναπνευστικού	Αν το παιδί είναι συμπτωματικό: Λοίμωξη Φτωχή συμμόρφωση Φτωχή τεχνική λήψης των φαρμάκων Προσθέστε βρογχοδιασταλτικά μακράς δράσης ή αντιλευκοτριένια Αυξήστε τη δόση των εισπνεομένων στεροειδών Αν το παιδί δεν έχει συμπτώματα: Μην αλλάξετε τη δόση των εισπνεομένων κορτικοστεροειδών
>35 (σημαντικά αυξημένες)	Σημαντική	• Πολύ πιθανή η διάγνωση του άσθματος • Πολύ πιθανή η θετική ανταπόκριση στα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή	Αν το παιδί είναι συμπτωματικό: Ό,τι ισχύει στις μέτριες τιμές και επιπλέον: Επικείμενη έξαρση ή υποτροπή (eNO>50 bpb) Αντίσταση στα κορτικοστεροειδή (σπάνια) Αν το παιδί δεν έχει συμπτώματα: Μην αλλάξετε τη δόση των εισπνεομένων κορτικοστεροειδών

η μεγάλη ευαισθησία των μετρήσεων. Μειονεκτήματα επί του παρόντος είναι το κόστος και η εξάρτηση της μεθόδου από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, ρύποι). Τεχνικές βελτιώσεις της μεθόδου προφανώς να αυξήσουν τη χρησιμότητά της στο μέλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention, 2006. In: Pocket guide for asthma management and prevention in children. 2006 Medical Communications Resources, Inc. p: 1-30. <http://www.ginasthma.org>.
2. Kharitonov S, Barnes P. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1693-1672.
3. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neuro-Oncol* 2000; 50: 139-148.
4. Bhagat K, Vallance P. Nitric oxide 9 years on. *J R Soc Med* 1996; 89: 667-673.
5. Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 7-20.
6. Dattilo J, Makhoul R. The role of nitric oxide in vascular biology and pathophysiology. *Ann Vasc Surg* 1997; 11: 307-314.
7. Barnes PJ. Transcription factors and inflammatory disease. *Hosp Pract (Minneap)* 1996; 31: 93-100.
8. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998; 12: 929-937.
9. Miller R, Britigan B. The formation and biologic significance of phagocyte- derived oxidants. *J Investig Med* 1995; 43: 39-49.
10. McCafferty D. Peroxynitrate and inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 46: 436-439.
11. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 538-551.
12. Grasemann H, Lax H, Treseler J, Colin A. Dornase alphas and exhaled NO in Cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38: 379-385.
13. Kroncke KD, Fehsei K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection- how, why, when and where? *Nitric Oxide Biol Chem* 1997; 1: 107-120.
14. Doerschuk C. NO and neutrophils during sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 205-210.
15. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.
16. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S. Glucocorticosteroids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1246.
17. ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-930.
18. ERS/ATS Statement, Measurement of exhaled nitric Oxide in children. *Eur Resp J* 2002; 20: 223-237.
19. Deykin A, Massaro AF, Coulston E, Drazen JM, Israel E. Exhaled NO following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1237-1240.
20. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Suzuki Y, Boner AL. Exhaled nitric oxide is reduced after sputum induction in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 430-433.
21. van Amsterdam JG, Verlaan BP, van Loveren H, Elzakker BG, Vos SG, Opperhuizen A, Steerenberg PA. Air pollution is associated with increased level of exhaled nitric oxide in nonsmoking healthy subjects. *Arch Environ Health* 1999; 54: 331-335.
22. Franklin PJ, Turner S, Mutch R, Stick SM. Parental smoking increases nitric oxide in young children. *Eur Respir J* 2006; 28: 730-733.
23. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1996; 9: 1130-1133.
24. Baraldi E, Carra S, Dario C, Azzolin N, Ongaro R, Marcer G. Effect of natural grass pollen exposure on exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 262-266.
25. Murphy AW, Platt-Mills TA, Lobo M, Hayden F. Respiratory nitric oxide levels in experimental human influenza. *Chest* 1999; 114: 452-456.
26. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, De Jongste J, Pijnenburg MW. Measurements of exhaled

- nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1130-1136.
27. Hatziagorou E, Sarafidou S, Kirvassilis F, Emboriadou M, Aivazis V, Tsanakas J. Reference values of exhaled nitric oxide for healthy children 5 to 14 years old. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 153A.
 28. Franklin PJ, Taplin R and Stick SM. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children, *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 69-673.
 29. Kissoon N, Duckworth LJ, Blake KV, Murphy SP, Taylor CL, Silkoff PE. FE(NO): relationship to exhalation rates and online versus bag collection in healthy adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 539-545.
 30. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 6765-6772.
 31. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998; 12: 929-937.
 32. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, et al. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 2000; 164: 5970-5980.
 33. Latzin P, Beck J, Griesse M. Exhaled nitric oxide in healthy children: variability and a lack of correlation with atopy. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13: 37-46.
 34. Barreto M, Villa MP, Monti F, Bohmerova Z, Martella S, Montesano M, et al. Additive effect of eosinophilia and atopy on exhaled nitric oxide levels in children with or without a history of respiratory symptoms. *Pedit Allergy Immunol* 2005; 16: 52-58.
 35. Χατζηαγόρου Ε, Κυρβασιλης Φ, Μαυρουδή Α, Εμποριάδου Μ, Αϊβάζης Β, Τσανάκας Ι. Εκπνεομένο Μονοξείδιο του Αζώτου (eNO), ατοπία και βρογχική υπεραντιδραστικότητα σε ασθματικά παιδιά. *Παιδιατρική Βορείου Ελλάδος* 2007; 20: 44-51.
 36. Lopushaa CE, Koopmans JG, Jansen HM, van der Zee JS. Similar levels of nitric oxide in exhaled air in nonasthmatic rhinitis and asthma after bronchial allergen challenge. *Allergy* 2003; 58: 300-305.
 37. Ryttilä P, Metso T, Heikkinen K, Saarelainen P, Helenius I, Haahtela T. Airway inflammation in patients with symptoms suggestive of asthma but with normal lung function. *Eur Respir J* 2000; 16: 824-830.
 38. Toom LM, Prins J, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, et al. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2107- 2113.
 39. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Cole P, Barnes PJ. Exhaled monoxides in patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: A585.
 40. Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson D, Durham SR, Chung KF, et al. Exhaled NO is elevated in difficult asthma and correlates with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Thorax* 1998; 53: 1030-1034.
 41. Langley SJ, Goldthorpe S, Custovic A, Woodcock A. Relationship among pulmonary function, bronchial reactivity, and exhaled nitric oxide in a large group of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91: 398-404.
 42. Kharitonov S, Barnes PJ, O'Connor B. Reduction in exhaled nitric oxide after a single dose of nebulised budesonide in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: A799.
 43. Carrü S, Gagliardi L, Zanconato S, Scollo M, Azzolin N, Zacchello F, et al. Budesonide but not nedocromil sodium reduces exhaled nitric oxide levels in asthmatic children. *Respir Med* 2001; 95: 734-739.
 44. Silkoff PE, Carlson M, Bourke T, Katial R, Ogren E, Szeffler SJ. The Aerocrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by US Food and Drug Administration for monitoring therapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1241-56.
 45. Smith A, Cowan J, Brassett K, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, et al. Exhaled nitric oxide.

- A predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 453-459.
46. Fuglsang G, Vikre JJ, Agertoft L, Pedersen S. Effect of salmeterol treatment on nitric oxide level in exhaled air and dose-response to terbutaline in children with mild asthma. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25: 314-321.
 47. Aziz I, Wilson AM, Lipworth BJ. Effects of once -daily formoterol and budesonide given alone or in combination on surrogate inflammatory markers in asthmatic adults. *Chest* 2000; 118: 1049-1058.
 48. Currie GP, Bates CE, Lee DK, Jackson CM, Lipworth BJ. Effects of fluticasone plus salmeterol versus twice the dose of fluticasone in asthmatic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 11-15.
 49. Whelan GJ, Blake K, Kissoon N, Duckworth LJ, Wang J, Sylvester JE. Effect of montelukast on time-course of exhaled nitric oxide in asthma: influence of LTC₄ synthase A (-⁴⁴⁴) C polymorphism. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36: 413-420.
 50. Grasmann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24: 173-177.
 51. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Exhaled nitric oxide is not elevated in the inflammatory airways diseases of cystic fibrosis and bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 12: 1290-1294.
 52. Downey D, Elborn JS. Nitric oxide, iNOS, and inflammation in cystic fibrosis. *J Pathol* 2000; 190: 115-116.
 53. Karadag B, James AJ, Gultekin E, Wilson NM, Bush A. Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 1999; 13: 1402-1405.
 54. Narang I, Ersu R, Wilson NM, Bush A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax* 2002; 57: 586-589.
 55. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 83-88.
 56. Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Exhaled nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 800-803.
 57. Chatkin JM, Ansarin K, Silkoff PE, McClean P, Gutierrez C, Zamel N, et al. Exhaled nitric oxide as a noninvasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1810-1813.
 58. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003; 123: 751-756.
 59. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002; 57: 383-387.
 60. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2163-2173.
 61. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. Clinical Use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1077-1082.
 62. Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, De Jongste JC. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in asthmatic children: a randomized control trial. *Am J Crit Care Med* 2005; 173: 831-836.
 63. Fritsch M, Uxa S, Horak F Jr, Putschoegl B, Dehlink E, Szepfalusi Z, et al. Exhaled nitric oxide in the management of childhood asthma: a prospective 6-months study. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 855-862.
 64. Hatziaorou E, Kirvassilis F, Tsanakas I. Exhaled nitric oxide (eNO): an early indicator of asthma relapse in children. *Eur Respir J* 2005; 26: 42S.
 65. Pijnenburg MW, Hofhuis W, Hop WC, Jongste JC. Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical asthma remission. *Thorax* 2005; 60: 215-218.
 66. de Jongste JC. Yes to NO: the first studies on exhaled nitric oxide-driven asthma treatment. *Eur Respir J* 2005; 26: 379-381.
 67. Silkoff PE. Monitoring nitric oxide: Here to stay for bench and bedside. *Eur Respir J* 2005; 25: 949-950.
 68. Pijnenburg MWH, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. *Clin Exp Allergy* 38: 246-259.

Αλλεργιολογικός έλεγχος

Μ. Ζήβα-Πετροπούλου, Ο. Φιλίππου

Η αύξηση του επιπολασμού των αλλεργικών νοσημάτων στην παιδική ηλικία τα τελευταία 20-30 χρόνια έχει οδηγήσει στην ανάγκη να διενεργούνται συχνότερα διαγνωστικοί αλλεργιολογικοί έλεγχοι. Είναι ευνόητο ότι ο κλινικός γιατρός χρειάζεται να επιλέξει τις κατάλληλες εξετάσεις ώστε να λάβει τις περισσότερες δυνατές πληροφορίες ακριβέστερα και ασφαλέστερα.

Η κλινική προβολή της αλλεργικής νόσου ποικίλει ανάλογα με την ηλικία. Στη βρεφική ηλικία επικρατούν η ατοπική δερματίτιδα, τα συμπτώματα από το πεπτικό και πιο άτυπα εκείνα του άσθματος. Στη νηπιακή και παιδική εκδηλώνεται συνήθως τυπικά αλλά επίσης άτυπα το άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα, και ακολουθούν οι εκδηλώσεις από το δέρμα.

Σχετικά με την ορολογία των αλλεργικών νοσημάτων και τη χρήση των όρων ατοπία και αλλεργία, περισσότερο αποδεκτή φαίνεται ότι είναι αυτή που προτάθηκε από ομάδα εμπειρογνομόνων της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (European Academy of Allergology and Clinical Immunology, EAACI) το 2001 και αναθεωρήθηκε σε ευρύτερο επίπεδο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό για την Αλλεργία (World Allergy Organization, WAO) δύο χρόνια αργότερα.^{1,2} Σύμφωνα με αυτήν, ως αλλεργία ορίζεται η αντίδραση υπερευαισθησίας στην οποία συμμετέχουν ανοσιακοί μηχανισμοί (αποδεδειγμένα ή με ισχυρή υπόνοια), ενώ για τις περιπτώσεις που ο ανοσιακός μηχανισμός δεν μπορεί να στοιχειοθετεί προτείνεται ο όρος *μη αλλεργική υπερευαισθησία*.

Η αλλεργική αντίδραση μπορεί να μεσολαβείται από αντισώματα ή να είναι κυτταρικού τύπου. Στους περισσότερους ασθενείς το υπεύθυνο αντίσωμα ανήκει στον IgE ισότυπο, πρόκειται δηλαδή για IgE-μεσολαβούμενη αλλεργία. Στη μη-IgE-μεσολαβούμενη αλλεργία μπορεί να είναι υπεύθυνοι διάφοροι μηχανισμοί, όπως τα IgG ανοσοσυμπλέγματα και η κυτταρική ανοσία.^{1,2}

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Παρότι η διάγνωση των περισσότερων αλλεργικών νοσημάτων γίνεται κλινικά, συχνά χρειάζεται να ολοκληρωθεί ή να επιβεβαιωθεί εργαστηριακά.³ Πολλοί είναι οι λόγοι που το υποστηρίζουν.

Κατ' αρχήν, αν τα συμπτώματα αποδοθούν σε αλλεργία, τότε είναι πιθανό να πρέπει να εφαρμοσθούν ειδικά μέτρα για την αποφυγή της έκθεσης στο αλλεργιογόνο και την αντιμετώπιση της νόσου. Ξεχωριστή σημασία έχει η έγκαιρη ανεύρεση των βρεφών υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη αλλεργικής νόσου. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να συσταθούν

μέτρα για αναστολή ή επιβράδυνση της εξέλιξής της. Εξ ίσου σημαντικός είναι ο αποκλεισμός της αλλεργίας ως υποκείμενης αιτίας συγκεκριμένων συμπτωμάτων προκειμένου να αποφευχθεί η χορήγηση άσκοπων θεραπευτικών σχημάτων και να στραφεί η διερεύνηση σε άλλα νοσήματα. Τέλος, ο αποκλεισμός της αλλεργίας μπορεί να έχει ως συνέπεια την αποφυγή λήψης μέτρων με επιπτώσεις στην ψυχολογία του παιδιού, όπως είναι η απομάκρυνση κατοικίδιων ζώων, ή την αποφυγή ενεργειών βλαπτικών στην υγεία του, όπως ο αποκλεισμός σημαντικών τροφίμων από το διαιτολόγιό του.⁴

Αναγνωρίζοντας την ανάγκη της έγκαιρης και αξιόπιστης διάγνωσης της αλλεργίας το Παιδιατρικό Τμήμα της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Αλλεργιολογίας δημοσίευσε τεκμηριωμένες οδηγίες σχετικά με τον διενεργούμενο αλλεργιολογικό έλεγχο.⁵

Γενικά, όλοι οι ασθενείς με σοβαρά, επίμονα ή υποτροπιάζοντα συμπτώματα που μπορεί να αποδοθούν σε αλλεργικό νόσημα καθώς και ασθενείς που χρειάζονται συνεχή ρυθμιστική αγωγή για αναπνευστική αλλεργία θα πρέπει να ελέγχονται ανεξάρτητα από την ηλικία. Η έκταση των αλλεργικών εξετάσεων θα εξαρτηθεί από την ηλικία του παιδιού, το θετικό οικογενειακό ιστορικό, τα πιθανολογούμενα αλλεργιογόνα, τον χαρακτήρα των συμπτωμάτων, την εποχικότητά τους ή τη διακύμανσή τους στη διάρκεια της ημέρας (Πίνακας 1).⁴⁻⁷

Φαρμακευτική αλλεργία

Σε περίπτωση φαρμακευτικής αλλεργίας αλλεργιολογικός έλεγχος συνιστάται όταν αναφέρονται συμπτώματα όπως, κνησμώνδεις δερματικές αντιδράσεις, κνίδωση, αγγειοοίδημα,

Πίνακας 1. Ενδείξεις αλλεργιολογικού ελέγχου

Γαστρεντερικά συμπτώματα: εμετός, διάρροια, κολικοί, ελλιπής αύξηση	Συνεχή ή διαλείποντα συμπτώματα χωρίς άλλη γνωστή αιτία, ιδιαίτερα επί ύπαρξης ατοπικού νοσήματος.
Ατοπική δερματίτιδα	Επίμονα συμπτώματα ή συμπτώματα συνδεδεμένα με αλλεργιογόνο, ιδιαίτερα επί συνύπαρξης άλλων ατοπικών συμπτωμάτων.
Οξεία κνίδωση/αγγειοοίδημα	Σοβαρές περιπτώσεις και/ή υπόνοια ειδικής αλλεργίας.
Χρόνια κνίδωση	Κνίδωση που διαρκεί >6 εβδομάδες.
Παιδιά <3-4 ετών με υποτροπιάζοντα συριγμό / άσθμα	Επίμονα συμπτώματα ή συμπτώματα και ανάγκη για συνεχή αγωγή. Παιδιά με παρατεινόμενο βήχα, συριγμό, δύσπνοια, ειδικά μετά από φυσική δραστηριότητα και κατά τη νύχτα, παιδιά με ελαττωμένη φυσική δραστηριότητα ή συχνές πνευμονίες χωρίς άλλη γνωστή αιτία.
Παιδιά >3-4 ετών με άσθμα	Πρέπει πάντα να ελέγχονται σε σχετικά αλλεργιογόνα. Πρέπει να ελέγχονται για ρινίτιδα.
Ρινίτιδα – Επιπεφυκίτιδα	Περιπτώσεις ανθεκτικές στη θεραπεία. Έλεγχος για συνύπαρξη άσθματος.
Δείγματα εντόμων	Μόνο σοβαρές συστηματικές αντιδράσεις III – IV βαθμού. Τοπικές αντιδράσεις και κνίδωση δεν έχουν ένδειξη ελέγχου.
Αναφυλαξία	Σε περίπτωση πρόκλησης, πάντοτε υπό ειδική επιτήρηση.

άσθμα και αναφυλαξία. Το κηλιδοβλατώδες εξάνθημα δεν αποτελεί ένδειξη για έλεγχο. Ειδικά για τον έλεγχο αλλεργίας στην πενικιλίνη φαίνεται ότι η συχνή χρήση του φαρμάκου και άλλων β-λακταμικών αντιβιοτικών στην παιδική ηλικία οδηγεί σε ευαισθητοποίηση σε όχι αμελητέο ποσοστό (10,2%), παρότι αυτά τα παιδιά μπορεί να είναι ασυμπτωματικά κατά το χρόνο ελέγχου.⁷

Σε περιπτώσεις υπόνοιας αντίδρασης υπερευαισθησίας σε βασικό και συχνά αναγραφόμενο φάρμακο, όπως β-λακτάμες, παρακεταμόλη, μη κορτικοστεροειδή αντιφλεγμονώδη, η διάγνωση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με ειδικό έλεγχο.⁸ Επιλέγονται εξετάσεις ανάλογα με τον πιθανό παθοφυσιολογικό μηχανισμό της αντίδρασης.⁹

Οι δερματικές δοκιμασίες συνιστάται να γίνονται 4-6 εβδομάδες μετά την αντίδραση, ενώ η ευαισθησία και η προγνωστική τους αξία ποικίλλει ανάλογα με το φάρμακο, από εξαιρετική (πενικιλίνες, μυοχαλαρωτικά, ετερόλογος ορός, ένζυμα), σε ικανοποιητική (εμβόλια, ορμόνες, οπιούχα, θειοπεντάλη, πρωταμίνη) έως μη ικανοποιητική (τοπικά αναισθητικά, παρακεταμόλη, σουλφοναμίδες, ιωδιούχα, ακτινοσκιερά μέσα, κινολόνες, κεφαλοσπορίνες, μη κορτικοστεροειδή αντιφλεγμονώδη).⁹

Όσον αφορά στα RAST, η ανίχνευση ειδικών IgE έναντι φαρμάκων (πενικιλινών, μυοχαλαρωτικών, χυμοπαπαΐνης, τοξοειδούς του τετάνου) δεν επιτρέπουν τη διάγνωση της αλλεργίας στο φάρμακο, αλλά σε συνδυασμό με τα κλινικά ευρήματα επιτρέπουν την απόδειξη του IgE μηχανισμού (και ειδικά σε συνδυασμό με θετική δερματική δοκιμασία). Η απουσία ειδικών IgE δεν αποκλείει τη διάγνωση, ενώ γενικά αυτή η μέθοδος δεν είναι διαθέσιμη για όλα τα φάρμακα.⁹

Η δοκιμασία πρόκλησης έχει την καλύτερη ευαισθησία αλλά πρέπει να γίνεται κάτω από συνεχή παρακολούθηση λόγω του κινδύνου αναφυλαξίας. Συνιστάται να γίνεται τουλάχιστον 1 μήνα μετά την αντίδραση, χρησιμοποιώντας το ίδιο φάρμακο και οδό χορήγησης. Αντενδείκνυται όταν το φάρμακο δε χρησιμοποιείται ευρέως και υπάρχουν εναλλακτικές λύσεις όπως επίσης όταν οι αντιδράσεις σχετίζονται με δερματικές εκδηλώσεις τύπου συνδρόμου Stevens – Johnson, τοξικής επιδερμολύσης και προσβολής οργάνου.⁹

Αλλεργία στο Latex

Στην περίπτωση αλλεργίας στο Latex πρέπει να γίνεται αλλεργιολογικός έλεγχος σε παιδιά αυξημένου κινδύνου, όπως τα παιδιά με δισχιδή ράχη, ουροποιογεννητικές ανωμαλίες και σε εκείνα με συμπτώματα κατά την επαφή τους με latex.¹⁰

Διασταυρούμενες αντιδράσεις

Συμβαίνουν όταν δύο ή περισσότερα αλλεργιογόνα μοιράζονται επιτόπους ή σε μερικές περιπτώσεις έχουν ίδιους επιτόπους και επομένως συνδέονται με τα ίδια IgE αντισώματα. Συνεπώς, ασθενείς ευαισθητοποιημένοι σε ένα από τα αλλεργιογόνα μπορεί να αντιδρούν και στο άλλο χωρίς προηγούμενη έκθεση και ευαισθητοποίηση και σε αυτό. Πολύ συχνά παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ γύρεων, τροφών και λαχανικών. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από διασταυρούμενη αντίδραση τροφίμου με γύρη περιλαμβάνουν κνησμό και οίδημα στο στοματοφάρυγγα, γνωστό ως *στοματικό αλλεργικό σύνδρομο*.¹¹

Συχνά η διάγνωση του συνδρόμου μπορεί να βασισθεί στο τυπικό ιστορικό σε άτομα με αλλεργία σε γύρεις αλλά σε ασαφείς περιπτώσεις μπορεί να φανεί χρήσιμη η ανεύρεση θετικών δερματικών δοκιμασιών ή ειδικών IgE αντισωμάτων στον ορό.

Ο ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Η λήψη του ολοκληρωμένου αλλεργιολογικού ιστορικού του παιδιατρικού ασθενούς αποτελεί τη βάση της διαγνωστικής διαδικασίας και περιλαμβάνει την αποτύπωση της συχνότητας και βαρύτητας των συμπτωμάτων, την καταγραφή πλήρους ατομικού και οικογενειακού ιστορικού και των περιβαλλοντικών –κυρίως ενδοοικιακών– παραγόντων στους οποίους εκτίθεται το παιδί. Με βάση το ιστορικό και τη φυσική εξέταση αποφασίζεται αν χρειάζονται ειδικότερες εξετάσεις και ποιες πρέπει να είναι.

Προσδιορισμός IgE στον ορό

Ολική IgE

Οι φυσιολογικές τιμές της ολικής IgE αυξάνουν σταδιακά με την ηλικία και φθάνουν τις τιμές των ενηλίκων στην προεφηβεία. Έχει διαπιστωθεί ότι οι χαμηλές τιμές της ολικής IgE του ορού δεν αποκλείουν την ευαισθητοποίηση σε κοινά εισπνεόμενα αλλεργιογόνα σε ασθενείς με συμπτώματα που θα μπορούσαν να είναι αλλεργικής αιτιολογίας, μειώνοντας έτσι την αρνητική προγνωστική αξία της εξέτασης.⁵

Υψηλότερες τιμές ολικής IgE μπορεί να συνδυάζονται με υψηλό κίνδυνο ευαισθητοποίησης, κυρίως σε νεαρά άτομα, αλλά η πρακτική σημασία αυτού του ευρήματος είναι περιορισμένη καθώς, αν υπάρχουν συμπτώματα, θα πρέπει να ακολουθήσει ειδικότερος έλεγχος. Η τιμή της ολικής IgE μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμη στην επιλογή των ασθενών με αρνητικό ειδικό έλεγχο, που έχουν αυξημένες πιθανότητες να είναι ευαισθητοποιημένοι σε αλλεργιογόνο που δεν ελέγχθηκε ή να αναπτύξουν ευαισθητοποίηση σε κοινό αλλεργιογόνο στο μέλλον.¹²

Ειδική IgE

Ο έλεγχος των ειδικών IgE στον ορό μπορεί να γίνεται σε κάθε ηλικία. Η παλαιότερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι γνωστή ως μέθοδος RAST (radio allegro sorbent test), αλλά η ορολογία συχνά χρησιμοποιείται ακόμα για την περιγραφή κάθε ανοσομέθόδου που ανιχνεύει ειδική IgE. Οι παλαιότερες και οι σύγχρονες ανοσομέθοδοι υπολείπονται σε ευαισθησία συγκρινόμενες με τα αποτελέσματα των δερματικών δοκιμασιών όταν αυτά διενεργούνται και ερμηνεύονται σωστά.¹³ Στην κλινική πράξη, οι ανοσομέθοδοι ανίχνευσης των ειδικών IgE στον ορό είναι χρήσιμοι όταν οι δερματικές δοκιμασίες δεν είναι δυνατόν να διενεργηθούν (Πίνακας 2).

Αν και τα αποτελέσματα συγκριτικών μελετών διαφέρουν, οι περισσότερες μελέτες, δείχνουν ευαισθησία επιπέδου 70-90% όταν οι ανοσομέθοδοι συγκρίνονται με τις δερματικές δοκιμασίες.¹³ Γενικά, θεωρείται ότι οι δερματικές δοκιμασίες που εκτελούνται και ερμηνεύονται προσεκτικά, υπό τις καλύτερες συνθήκες, συνήθως συμφωνούν με αυτά της μέτρησης των ειδικών IgE στον ορό που επίσης διενεργούνται με τις σύγχρονες ανοσομέθόδους. Σε κάθε περίπτωση, και οι δύο παρουσιάζουν μειονεκτήματα που σχετίζονται με τεχνικούς παράγοντες καθώς επίσης την εκπαίδευση και εμπειρία του ατόμου που τις διενεργεί. Το θέμα της ευαισθησίας της μεθόδου είναι σημαντικό στην περίπτωση της αναζήτησης της αιτιολογίας αναφυλακτικής αντίδρασης όπως στο latex, ή τα δήγματα υμενοπτερών. Στην περίπτωση αυτή η αρνητική ειδική IgE στον ορό πρέπει να επιβεβαιώνεται με δερματική δοκιμασία και το αντίστροφο. Τελικά, παρά το γεγονός ότι η ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων στον ορό φέρεται ως μέθοδος διάγνωσης αλλεργικής νόσου, θα πρέπει να θεωρείται

Πίνακας 2. Κλινικές ενδείξεις ανίχνευσης ειδικών IgE στον ορό.

- Ισχυρές ενδείξεις
- Ισχυρή κλινική υπόνοια για αλλεργική ευαισθητοποίηση με αρνητικά ή αμφίβολα αποτελέσματα δερματικών δοκιμασιών.
- Έλεγχος για αλλεργιογόνο (latex, βιοχημικά, χημικά) που υπάρχει δυσκολία στην ανεύρεση εκχυλίσματος για δερματικές δοκιμασίες.
- Ασθενείς υπό αγωγή με φάρμακα (αντιισταμινικά) που δεν πρέπει να διακοπούν για διενέργεια δερματικών δοκιμασιών.
- Εκτίμηση πιθανής αλλεργικής ασπεργίλλωσης.
Σχετικές ενδείξεις
Περιορισμένος έλεγχος αλλεργίας σε ασθενή με άσθμα, ρινίτιδα, ατοπική δερματίτιδα ή άλλες καταστάσεις με υπόνοια αλλεργικής ευαισθητοποίησης.
- Ένδειξη για έλεγχο αλλεργιογόνου που δε διατίθεται για δερματική δοκιμασία.
- Ο θετικός μάρτυρας στη δερματική δοκιμασία είναι αρνητικός (αρνητική δερματική δοκιμασία ισταμίνης).
- Πολύ μικρά παιδιά και ηλικιωμένοι.
- Ιδιαίτερα σοβαρός δερμογραφισμός, εκτεταμένη δερματική βλάβη.
- Αυξημένος κίνδυνος για συστηματική αντίδραση μετά από δερματική δοκιμασία (π.χ. μη ελεγχόμενο άσθμα, αναφυλαξία).
- Κύηση
- Ποσοτικά αποτελέσματα χρήσιμα στην κλινική εκτίμηση της ατοπικής δερματίτιδας και άλλων καταστάσεων αλλεργικής ευαισθητοποίησης.

μόνο ως έλεγχος παρουσίας ή απουσίας ανιχνεύσιμης ειδικής IgE. Επιπλέον δεν θα πρέπει να αγνοείται ότι χαμηλά επίπεδα ειδικών IgE ορού σε διάφορα αλλεργιογόνα μπορεί να μην έχουν κλινική σημασία.¹³

Υψηλή αξιοπιστία έχουν οι ανοσομέθοδοι με ποσοτικό έλεγχο των ειδικών IgE στον ορό (π.χ. CAP System FEIA) στην περίπτωση της τροφικής αλλεργίας. Για πολλά τροφικά αλλεργιογόνα υπάρχουν πίνακες με τα διαγνωστικά επίπεδα των ειδικών IgE στον ορό (Πίνακας 3). Όταν ο ασθενής έχει επίπεδα που υπερβαίνουν αυτές τις τιμές υπάρχει πιθανότητα μεγαλύτερη του 95% να εμφανίσει αλλεργική αντίδραση με την κατανάλωση των τροφίμων που περιέχουν το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο, ενώ υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της ειδικής IgE και της πιθανότητας εμφάνισης αλλεργικής αντίδρασης. Φαίνεται ότι ο κλινικός γιατρός, λαμβάνοντας υπόψη το ιστορικό και με επίπεδα ειδικής IgE με θετική προγνωστική σημασία 60%, μπορεί να θέσει τη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας, ενώ επίπεδα μικρότερα των 0,35 ku/l που θεωρούνται αρνητικά για τον ασθενή δε μπορούν να αποκλείσουν απολύτως αλλεργική αντίδραση.^{14, 15}

Ο έλεγχος των ειδικών IgE στον ορό και οι δερματικές δοκιμασίες νυγμού είναι χρήσιμες εξετάσεις τα αποτελέσματα των οποίων μπορεί να αλληλοσυμπληρωθούν ανάλογα με το ιστορικό.

Δερματικές δοκιμασίες νυγμού

Με τις δερματικές δοκιμασίες νυγμού διαπιστώνεται *in vivo* η παρουσία IgE αντισωμάτων έναντι των ελεγχόμενων αλλεργιογόνων. Πρόκειται για μέθοδο τεχνικά απλή, ακριβή ως προς την αξιοπιστία του αποτελέσματος και ασφαλή.

Πίνακας 3. Προγνωστική αξία των ειδικών IgE επιπέδων έναντι τροφικών αντιγόνων¹⁴

Αλλεργιογόνο	[KUA IL]	Θετική προγνωστική αξία
Αυγό	7	98
βρέφη ≤2 ετών	2	95
Γάλα	15	95
βρέφη ≤2 ετών	5	95
Φιστίκι	14	100
Ψάρι	20	100
Ξηροί καρποί δένδρων	~15	~95
Σόγια	30	73
Σιτηρά	26	74

Συνήθως χρησιμοποιούνται σταθερά διαλύματα, αλλά όταν ελέγχονται τροφικά αλλεργιογόνα μπορεί να χρησιμοποιηθούν και φρέσκα υλικά. Για τη διενέργεια των δερματικών δοκιμασιών δεν υπάρχουν κατώτερα ηλικιακά όρια. Μέση διάμετρος διήθησης μεγαλύτερη των 3 mm του αρνητικού μάρτυρα σημαίνει θετική αντίδραση. Η ομάδα των αλλεργιογόνων που ελέγχονται εξαρτάται από την ηλικία, το ατομικό ιστορικό και τον τόπο διαμονής του ασθενούς.¹⁶

Δεν μπορούν να γίνουν σε περιοχή με ενεργό έκζεμα, ή όπου χορηγείται τοπικό κορτικοστεροειδές ή ανοσορρυθμιστική αλοιφή. Επίσης πρέπει να διακόπτεται η χορήγηση αντιισταμινικών τουλάχιστον για μερικές ημέρες πριν από την εξέταση, ανάλογα με το σκεύασμα.

Σε περίπτωση ελέγχου για τροφική αλλεργία, θετική δερματική δοκιμασία καθιστά πιθανή τη συμπτωματική αντίδραση σε αυτό το τρόφιμο.¹⁴ Ωστόσο, έχουν προταθεί διαγνωστικά όρια για παιδιά με αλλεργία στο γάλα αγελάδας, το αυγό και το φιστίκι, μετά από συσχέτιση με ανοικτή τροφική πρόκληση. Διάμετρος διήθησης ≥ 8 mm θεωρείται διαγνωστική για αλλεργία στο γάλα αγελάδας, ≥ 7 mm στο αυγό και ≥ 8 mm στο φιστίκι. Για παιδιά μικρότερα των 2 ετών οι αντίστοιχες διαμέτροι είναι ≥ 6 mm, ≥ 5 mm και ≥ 4 mm.¹⁴

Οι αρνητικές απαντήσεις στις δερματικές δοκιμασίες επιβεβαιώνουν την απουσία IgE-μεσολαβούμενης αντίδρασης με αρνητική προγνωστική αξία μεγαλύτερη από 95%.¹⁵

Αλλεργικές Προκλήσεις

Τροφική αλλεργία

Η διάγνωση της τροφικής αλλεργίας μπορεί να βασισθεί μόνο στο ιστορικό σε συνδυασμό με τις δερματικές δοκιμασίες και/ή τον προσδιορισμό των ειδικών IgE στον ορό μόνο σε περίπτωση πλήρους συμφωνίας ανάμεσα τους.

Η τροφική πρόκληση, που αποτελεί ασφαλή διαγνωστική μέθοδο, περιλαμβάνει περίοδο 2-4 εβδομάδων αποκλεισμού του υπόπτου τροφίμου από το διαιτολόγιο κατά την οποία τα συμπτώματα θα πρέπει να υποχωρήσουν ή να βελτιωθούν σημαντικά. Η επαναχορήγηση του τροφίμου, μπορεί να γίνει ως ανοικτή ελεγχόμενη τροφική πρόκληση εφόσον αναμένονται αντικειμενικά συμπτώματα. Για την απόδειξη έξαρσης της ατοπικής δερματίτιδας με κατανάλωση ενός τροφίμου είναι προτιμότερη η διπλή τυφλή μέθοδος τροφικής πρόκλησης.¹⁷

Σε παιδιά μεγαλύτερα των 2-3 ετών, θετική ανοικτή πρόκληση μπορεί να χρειάζεται επιβεβαίωση με διπλή τυφλή μέθοδο τροφικής πρόκλησης για να αποφευχθούν ψευδώς θετικές αντιδράσεις που οφείλονται σε ψυχολογικούς ή άλλους μηχανισμούς ή στο σύνδρομο Munchausen by proxy.⁵

Οι τροφικές προκλήσεις πρέπει να γίνονται πάντα υπό ιατρική επίβλεψη και σε περιβάλλον με επαρκή εξοπλισμό ανάνηψης.¹⁴ Ειδικά για την αλλεργία στο γάλα αγελάδας, που απαντάται με αυξημένη συχνότητα στη βρεφική ηλικία (2-7,5%), πρόσφατα δημοσιεύθηκαν οδηγίες από επιτροπή Ευρωπαίων εμπειρογνομόνων.¹⁸ Ως χρυσούς κανόνες αναφέρεται η δίαιτα αποκλεισμού για 2-4 εβδομάδες και επαναχορήγησή του με σταδιακά αυξανόμενες ποσότητες, σε μεσοδιαστήματα 15 min. Για τον ρόλο των in vivo και in vitro δοκιμασιών οι συγγραφείς αναφέρουν ότι καμία από τις διαθέσιμες δεν καταδεικνύει την ύπαρξη ή όχι αλλεργίας στο γάλα αγελάδας. Παρά ταύτα, ο κλινικός γιατρός μπορεί να διενεργήσει δερματικές δοκιμασίες με φρέσκο γάλα ή διάλυμα πλήρους γάλακτος αγελάδας ή να προσδιορίσει τις ειδικές IgE στον ορό ή των πρωτεϊνών του ξεχωριστά. Η συνολική σύμπτωση της θετικής δερματικής δοκιμασίας και της θετικής πρόκλησης ήταν 58,8% για τα εμπορικά διαλύματα και 91,7% με το φρέσκο τρόφιμο.¹⁸

Τα αποτελέσματα των ελέγχων μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερη αντιμετώπιση. Οι δερματικές δοκιμασίες και τα RAST είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην πρόγνωση και τον προσδιορισμό του μεσοδιαστήματος για την επόμενη πρόκληση προκειμένου να εκτιμηθεί η ανάπτυξη ανοχής (Πίνακας 3).¹⁹ Η διαγνωστική προσέγγιση της τροφικής αλλεργίας φαίνεται στη Σχήμα 1.

Αναπνευστική αλλεργία

Σε περίπτωση πλήρους σύμπτωσης μεταξύ του ιστορικού (συμπτώματα κατά την έκθεση στο αλλεργιογόνο) και του αποτελέσματος των ειδικών IgE στον ορό ή της δερματικής δοκιμασίας δεν υπάρχει λόγος διενέργειας πρόκλησης. Σε αμφίβολες περιπτώσεις και σε περιπτώσεις επίμονων συμπτωμάτων και/ή αλλεργίας σε αλλεργιογόνα του περιβάλλοντος, οι ειδικές προκλήσεις με αλλεργιογόνο μπορεί να είναι χρήσιμες ή και απαραίτητες, ειδικά εφόσον τίθεται θέμα έναρξης ειδικής ανοσοθεραπείας. Καθώς υπάρχει επαρκής συσχέτιση της υπεραπαντητικότητας στην ειδική πρόκληση στα διάφορα όργανα-στόχος, θα πρέπει να προτιμάται η απλή πρόκληση του επιπεφυκότα από τις πιο σύνθετες και επικίνδυνες ειδικές ρινικές και βρογχικές προκλήσεις.⁵ Οι ειδικές προκλήσεις επιπεφυκότων, ρινός και βρόγχων θα πρέπει να διενεργούνται με σταθερά αλλεργικά διαλύματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (Σχήμα 2).⁵

Ειδικές βρογχικές προκλήσεις δεν θα πρέπει να διενεργούνται πριν από την ηλικία των 5-6 ετών, λόγω της αναγκαίας καλής συνεργασίας και ικανότητας του παιδιού να εκτελεί αξιόπιστες μετρήσεις πνευμονικής λειτουργίας.

Άλλες Δοκιμασίες

Πρόκειται για ελέγχους που έχουν κυρίως ερευνητικό σκοπό και γίνονται από ειδικούς. Αναφέρονται συνοπτικά οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες δοκιμασίες.

Δοκιμασία έκλυσης ισταμίνης

Μετράται η έκλυση ισταμίνης από τα κοκκιοκύτταρα των βεσεόφιλων. Τα αποτελέσματα έχουν δειχθεί συγκρίσιμα προς αυτά των δερματικών δοκιμασιών και των ειδικών IgE στον



Σχήμα 1. Διαγνωστική προσέγγιση τροφικής αλλεργίας στα παιδιά.

ορό. Αν και πρόκειται για εξέταση πολύπλοκη για την καθημερινή πράξη, μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στις φαρμακευτικές αλλεργίες, και τις αντιδράσεις σε ασυνήθη αλλεργιογόνα, όπως σπάνια τροφικά ή φάρμακα.⁵

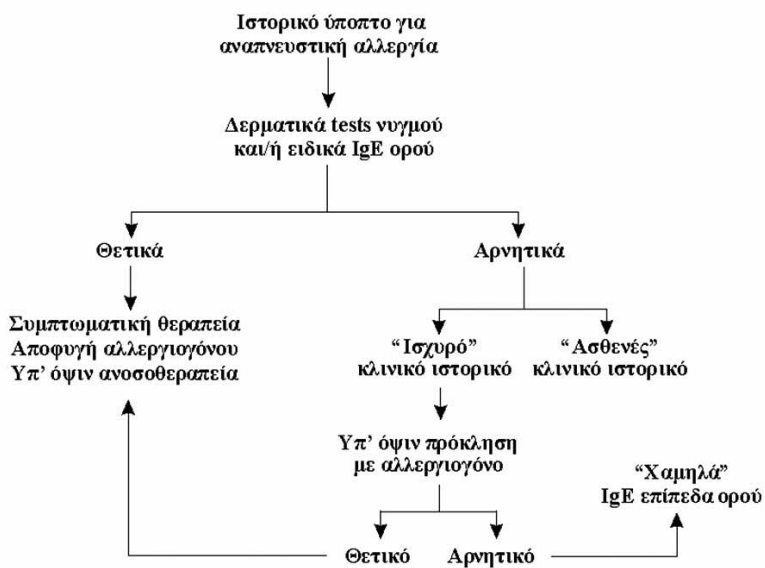
Επιδερμικές δερματικές δοκιμασίες

Περισσότερο είναι γνωστά ως *patch tests*. Αρκετοί ερευνητές έχουν εξετάσει τη χρησιμότητα τους στη διάγνωση της μη IgE-μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας, κυρίως σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα και αλλεργική ηωσινοφιλική οισοφαγίτιδα. Αν και ορισμένα αποτελέσματα φαίνονται ενθαρρυντικά για την εντόπιση τροφών που εκλύουν μη IgE-μεσολαβούμενες αντιδράσεις, δεν υπάρχουν ακόμα σταθερά αντιδραστήρια και μέθοδοι εφαρμογής και ερμηνείας των αποτελεσμάτων.^{14,18, 21}

Έλεγχος ενδοοικιακών και εξωοικιακών αλλεργιογόνων

Ο προσδιορισμός του αλλεργικού φορτίου σε δείγματα σκόνης σπιτιού για ενδοοικιακά αλλεργιογόνα, όπως τα ακάρεα και επιθήλια κατοικίδιων ζώων, μπορεί να είναι χρήσιμος προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός έκθεσης στα υπό έλεγχο αλλεργιογόνα και να ελεγχθούν τα μέτρα αποφυγής που μπορεί να εφαρμόζονται.

Τέλος, υπάρχουν μέθοδοι ελέγχου των συγκεντρώσεων των εξωοικιακών αλλεργιογόνων όπως των γύρεων και μυκήτων.



Σχήμα 2. Διαγνωστική προσέγγιση αναπνευστικής αλλεργίας στα παιδιά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο αλλεργιολογικός έλεγχος συνεισφέρει σημαντικά στην έγκαιρη εντόπιση παιδιών αυξημένου κινδύνου για αλλεργικά νοσήματα και την ειδική αντιμετώπισή τους.

Τα παιδιά με επίμονα, σοβαρά ή υποτροπιάζοντα συμπτώματα δηλωτικά αλλεργικού νοσήματος καθώς και εκείνα που χρειάζονται συνεχή θεραπευτική αγωγή θα πρέπει να υφίστανται τον κατάλληλο έλεγχο με λεπτομερές ιστορικό και δερματικές δοκιμασίες νυγμού ή προσδιορισμό ειδικής IgE στον ορό. Σε περίπτωση τροφικής αλλεργίας, εκτός από τα προαναφερθέντα, η διάγνωση θα πρέπει να βασιστεί σε ελεγχόμενη διακοπή του υπόπτου τροφίμου και επαναχορήγηση σε περιπτώσεις μη πλήρους σύμπτωσης του ιστορικού με τα αποτελέσματα προσδιορισμού IgE ευαισθητοποίησης. Η αλλεργική πρόκληση μπορεί να είναι χρήσιμη σε αμφίβολες περιπτώσεις και ειδικά εάν πρόκειται να ακολουθήσει ειδική αλλεργική θεραπεία όπως ανοσοθεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56: 813-824.
2. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832-836.
3. Eigenmann PA. Diagnosis of allergy syndromes: do symptoms always mean allergy? *Allergy* 2005; 60 (Suppl 79): 6-9.
4. Eigenmann PA. Breaking frontiers for better early allergy diagnosis. *Allergy* 2004; 59: 895-896.

5. Host A, Andrae S, Charkin S, Diaz-Vazquez C, Dreborg S, Eigenmann PA, et al. Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy* 2003; 58: 559-569.
6. Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda, MD: National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. Revised 2006. www.ginasthma.org
7. Muller UR. Hymenoptera venom hypersensitivity: an update. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 4-6.
8. Cetinkaya, F, Cag Y. Penicillin sensitivity among children without a positive history for penicillin allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 278-280.
7. Torres MJ, Romano A, Mayorga C, Moya MC, Guzman AE, Reche M, et al. Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing. *Allergy* 2001; 56: 850-856.
8. Demoly P, Bousquet J. Drug allergy diagnosis work up. *Allergy* 2002; 57 (Suppl. 72): 37-40.
9. Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler W, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002; 57: 45-51.
10. Brehler R, Kutting B. Natural rubber latex allergy: a problem of interdisciplinary concern in medicine. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1057-1064
11. Anhoej C, Backer V, Nolte H. Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome. *Allergy* 2001; 56: 548-552.
12. Kerkhof M, Dubois AE, Postma DS, Schouten JP, de Monchy JG. Role and interpretation of total serum IgE measurements in the diagnosis of allergic airway disease in adults. *Allergy* 2003; 58: 905-911.
13. Dolen WK. IgE antibody in the serum-detection and diagnostic significance. *Allergy* 2003; 58: 717-723.
14. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-819.
15. Hill DJ, Heine RG, Hosking CS. The diagnostic value of skin prick testing in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 435-441.
16. Dreborg S. Diagnosis of food allergy: tests in vivo and in vitro. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12 (Suppl 14): 24-30.
17. Sampson HA. Food allergy – accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005; 60 (Suppl 79): 19-24.
18. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, Hill D, Oranje AP, Brueton M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007; 92: 902-908.
19. Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A, Staden U, Nocon M, Beyer K, et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 268-273.
20. Canani RB, Ruotolo S, Auricchio L, Caldore M, Porcaro F, Manguso F, et al. Diagnostic accuracy of the atopy patch test in children with food allergy-related gastrointestinal symptoms. *Allergy* 2007; 62: 738-743.

Μοριακή γενετική: Διάγνωση και εφαρμογές στην ιατρική

Μ. Τζέτη, Ε. Καναβάκης

Οι εξελίξεις στη γενωμική, δηλαδή τη μελέτη των γονιδίων και της λειτουργίας τους, και ο διαρκώς αυξανόμενος αριθμός δεδομένων από το πρόγραμμα προσδιορισμού της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) επιτάσσουν την περαιτέρω ανάπτυξη υψηλής τεχνολογίας προκειμένου να αναδειχθούν καινούργιοι βιολογικοί στόχοι για το σχεδιασμό νέων θεραπειών και φαρμάκων, καθώς και για τη διαλεύκανση των βιοχημικών μηχανισμών στους οποίους συμμετέχουν τα γονίδια και των τρόπων με τους οποίους εμπλέκονται σε νοσήματα.

Πολλά γενετικά νοσήματα προκαλούνται από ένα ευρύ φάσμα σημειακών μεταλλάξεων. Για την εφαρμογή των προγραμμάτων πρόληψης, ιδιαίτερα όταν οι φορείς δεν μπορούν να εντοπιστούν με βιοχημικές ή αιματολογικές εξετάσεις, η μοριακή ανάλυση του DNA αποτελεί τον μοναδικό τρόπο εντοπισμού των φορέων. Η μέθοδος που θα εφαρμοσθεί θα πρέπει να συνδυάζει ευελιξία προσαρμογής στις ιδιαιτερότητες της μοριακής ετερογένειας κάθε πληθυσμιακής ομάδας, να έχει σχετικά μικρό κόστος, να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για εφαρμογές κλινικής διάγνωσης και να είναι εύκολη στη χρήση.

Η ανάπτυξη σύγχρονης τεχνολογίας ανίχνευσης μονονουκλεοτιδικών αλλαγών (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) θα αποδειχθεί απαραίτητη και για τα πολυπαραγοντικά / πολυγονιδιακά νοσήματα που οφείλονται συνήθως σε σπάνιες σημειακές αλλαγές ή ελλείμματα λίγων βάσεων ή ακόμη και σε πολυμορφικούς διπλασιασμούς ή ελλείμματα μεγάλων περιοχών των χρωμοσωμάτων που επηρεάζουν τη λειτουργία πολλών γονιδίων.

Η επίτευξη αυτών των στόχων απαιτεί την ανάπτυξη τεχνολογίας που θα επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση της έκφρασης χιλιάδων γονιδίων (σε επίπεδο mRNA) καθώς και την ανάλυση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων (σε επίπεδο DNA). Νέες τεχνολογίες, όπως αυτή των μικροσυστοιχιών, στο μέλλον θα διαδραματίσουν πολύσημαντικό ρόλο.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Ιστορικό

Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary B. Mullis που βραβεύτηκε με το NOBEL χημείας το 1993.^{1,2} Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ήταν το σημείο έκρηξης στη μοριακή διαγνωστική. Ουσιαστικά αντικατέστησε την παλιά τεχνική του Southern Blotting (1975), η οποία ήταν χρονοβόρα. Η χαρτογράφηση των γονιδίων, ο χαρακτηρισμός απλοτύπων (RFLPs), και ο έλεγχος για ευρείες αναδιατάξεις (ελλείμματα,

ενθέσεις) στο γονιδίωμα γινόταν με την τεχνική του Southern Blotting και την χρήση ειδικών ενδονουκλεασών (restriction endonucleases). Οι ενδονουκλεάσες χρησίμευαν για την κατάτμηση του μορίου του DNA σε μικρότερα τμήματα, λόγω της ιδιότητάς τους να κόβουν το μόριο του DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες και να κάνουν ευκολότερη την μελέτη του. Η τεχνική του Southern blotting βασίζεται, όπως εξάλλου και όλες σχεδόν οι τεχνικές της μοριακής γενετικής, στην ενδογενή ιδιότητα της συμπληρωματικότητας των βάσεων του μορίου του DNA και ως εκ τούτου στην συμπληρωματικότητα των δύο αλυσών του δίκλωνου DNA. Η όλη διαδικασία, εκτός του ότι ήταν αρκετά χρονοβόρα, απαιτούσε και τη χρήση ραδιενέργειας. Η ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων ακολουθούσε απαραίτητα την κλωνοποίηση του τμήματος του DNA με χρήση πλασμιδίων, τον πολλαπλασιασμό τους σε βακτήρια προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα και εν συνεχεία την ανάλυση της αλληλουχίας (1978), διαδικασία που απαιτούσε μήνες για τη μελέτη κάθε γονιδίου. Επομένως, η πλήρης ανάλυση του γονιδιώματος θα ήταν μία διαδικασία πρακτικά ακατόρθωτη.

Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης PCR

Οι αρχικά χρησιμοποιούμενες πολυμεράσες ήταν μη θερμοανθεκτικές και έπρεπε να προστεθούν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η όλη διαδικασία, πριν την εμφάνιση των θερμικών κυκλοποιητών γινόταν με τρία υδατόλουτρα σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες και, με ρομποτικό σύστημα ή χειροκίνητα, μεταφέρονταν τα σωληνάρια στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Το 1986 εμφανίστηκαν οι θερμοικοί κυκλοποιητές και το 1988 η θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση. Τέλος, το 1991 έγινε η ανακάλυψη της θερμοανθεκτικής αντίστροφης μεταγραφάσης (rTth), που υπήρξε ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη των RNA ών και για αντίστροφη μεταγραφή από RNA σε cDNA για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων.^{3,4}

Οι βιοτεχνολογικές αυτές εξελίξεις έκαναν δυνατή την αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η πρόσβαση στις πληροφορίες της αλληλουχίας γονιδίων είναι πλέον ελεύθερη στο διαδίκτυο για όλους τους χρήστες εργαστηρίων γενετικής και συνεχώς ανανεώνεται με νέες ανακαλύψεις για μόρια που εμπλέκονται στη ρύθμιση έκφρασης του γονιδιώματος. Η γνώση αυτή έχει απλουστεύσει κατά πολύ την έρευνα για εύρεση μεταλλάξεων / πολυμορφισμών που είναι υπεύθυνα για μονογονιδιακά και πολυγονιδιακά νοσήματα και έφερε αλλαγές στην βιοϊατρική. Ήταν από παλιά γνωστό ότι ο γενετικός παράγοντας παίζει ρόλο στην εμφάνιση όλων των νοσημάτων, και η χρήση γενετικών πληροφοριών βοηθάει όλο και περισσότερο στη διάγνωση και την αποτελεσματικότερη θεραπεία των ασθενών. Η ταχύτατη ανάπτυξη της έρευνας θα βοηθήσει στη βελτίωση και εξατομίκευση της φαρμακευτικής αγωγής και πιθανόν στην επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας.

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Το πρώτο στάδιο κάθε σύγχρονης μοριακής μεθοδολογίας βασίζεται πλέον στον πολλαπλασιασμό του υπό μελέτη γονιδίου με την PCR. Οι μοριακές τεχνικές βοηθούν στη διερεύνηση γενετικών νοσημάτων, μονογονιδιακών και πολυγονιδιακών για τον εντοπισμό μεταλλάξεων / πολυμορφισμών (SNPs) στα υπεύθυνα γονίδια. Ιδιαίτερα για τα μονογονιδιακά νοσήματα η γενετική διάγνωση βοηθάει στη διευκρίνιση των άτυπων μορφών (π.χ. ήπιες μορφές και μόνο-συμπτωματικές μορφές κυστικής ίνωσης), στην πρόληψη με την ανίχνευση φορέων και παροχή προγεννητικής και προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης (ΠΓΔ) και στην προκλινική διάγνωση, όπως η διάγνωση ασθενών με νόσο Wilson πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων.⁵⁻⁷

Σημαντική είναι η προσφορά της γενετικής διάγνωσης στις λοιμώξεις (ταχύτερη διάγνωση και ταυτοποίηση του μικροοργανισμού) και στον καρκίνο (ιδιαίτερα στον εντοπισμό υπολειπόμενης νόσου).⁸

Τέλος, για τα κοινά νοσήματα όπως καρδιοπάθειες, οστεοαρθρίτιδα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η ταυτοποίηση μονονουκλεοτιδικών αλλαγών (SNPs) αλλά και πολυμορφικών ενθέσεων ή ελλείψεων μεγάλων χρωμοσωμικών τμημάτων (Copy Number Variations-CNVs) αποτελεί πρόσφατη διαρκή μοριακή αναζήτηση για την εύρεση των εμπλεκόμενων γονιδίων που, όπως φαίνεται, για κάθε νόσημα ανήκουν σε συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Περιγραφή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Η PCR που ουσιαστικά μιμείται την φυσιολογική διεργασία πολλαπλασιασμού DNA στο κύτταρο, επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση συγκεκριμένου τμήματος αλληλουχίας του DNA μεγέθους από 100 ζεύγη βάσεων (ζβ) έως >2000, σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών. Η PCR παράγει πολλαπλά αντίγραφα ($\sim 1 \times 10^9$) ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, που οριοθετείται από τις αλληλουχίες των εκκινητών, ξεκινώντας ακόμη και από απειροελάχιστη ποσότητα υποστρώματος (1-2 κύτταρα).

Βασίζεται στην ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει συμπληρωματική έλικα DNA σε κατεύθυνση 5'→3', χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA και ξεκινώντας από μία περιοχή δίκλωνου DNA. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές, οι οποίοι είναι μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 19-20 βάσεων που υβριδίζονται με τις αντίθετες συμπληρωματικές αλυσίδες του υποστρώματος DNA (template) που έχουν αποδιαταχθεί σε υψηλή θερμοκρασία. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για 20-40 κύκλους, και κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια, αποδιάταξη του υποστρώματος DNA, υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες του DNA και επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εκθετική συγκέντρωση του συγκεκριμένου τμήματος DNA που οριοθετείται από τα 5' άκρα των εκκινητών (Εικόνα 1).

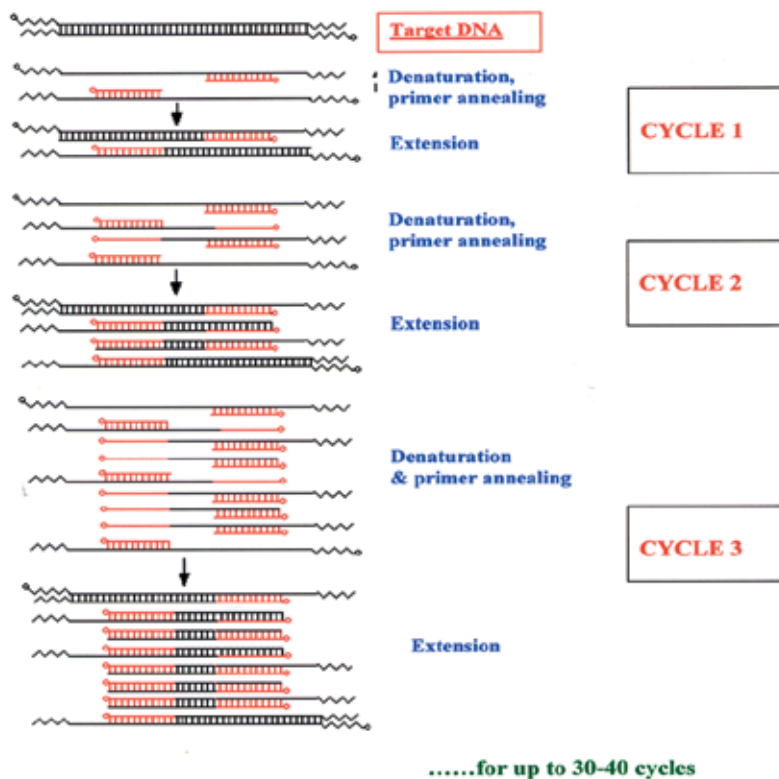
Η αντίδραση γίνεται σε ένα μικρό σωληνάριο και σε όγκο συνήθως 10-50 μl που περιέχει δεοξυριβοτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ένζυμο DNA πολυμεράση (θερμοανθεκτική), ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές, υπόστρωμα DNA (template) και ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα.

Αναλυτικότερα, η PCR αποτελείται από τα εξής 3 στάδια:

- 1) Αποδιάταξη (Denaturation) του υποστρώματος DNA σε υψηλή θερμοκρασία 94-96°C και συνήθως για 60 sec. Το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται.
- 2) Υβριδισμός (Annealing) των δύο εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις απέναντι αλυσίδες του DNA. Ο υβριδισμός των εκκινητών με το υπόστρωμα πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 37-70°C για 60 sec. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι καθοριστική για την ειδικότητα της αντίδρασης PCR και προσδιορίζεται εμπειρικά ανάλογα με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των εκκινητών (2°C για κάθε θυμίνη "T" και αδερίνη "A", 4°C για κάθε γουανίνη "G" και κυτοσίνη "C").
- 3) Επιμήκυνση (Extension) των υβριδισμένων εκκινητών και σύνθεση συμπληρωματικού DNA, που γίνεται σε θερμοκρασία συνήθως 72°C και για 1-2 min και καταλύεται από τη θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση με την παρουσία περίσσειας dNTPs.^{3,4}

Η PCR δίνει τη δυνατότητα:

- Ανίχνευσης και χαρακτηρισμού σημειακών μεταλλάξεων



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης PCR.

- Ανίχνευσης ελλειμμάτων και προσθηκών τμημάτων DNA όταν είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA στα σημεία του ελλείμματος ή της προσθήκης
- Ανίχνευση υπολειμματικής νόσου
- Μεθυλίωση (επιγενετικές αλλαγές)
- Δυνατότητα μελέτης έκφρασης των γονιδίων (mRNA-cDNA).

Ως πηγή DNA, ανάλογα με την μελέτη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περιφερικό αίμα, ιστός (πρόσφατος ή συντηρημένος), κυτταρικές σειρές, κάρτες Guthrie, κύτταρα στοματικού βλεννογόνου, κύτταρα ρινικού βλεννογόνου, αμνιακό υγρό / τροφοβλάστη (ΠΔ), 1 βλαστομερίδιο ή κύτταρα από βλαστοκύστη για την εφαρμογή Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης (ΠΓΔ). Για την εφαρμογή της PCR στις λοιμώξεις υλικό για εκχύλιση DNA/RNA μπορεί να είναι ορός, πλάσμα, ούρα, κόπρανα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Στην εφαρμογή διερεύνησης υπολειπόμενης νόσου στον καρκίνο ως υλικό εκχύλισης DNA/RNA χρησιμοποιείται συνήθως δείγμα λεμφαδένων, περιφερικό αίμα και μυελός οστών.^{7,9-11}

Είδη PCR

- *Απλή PCR*: Οι εκκινητές είναι απόλυτα συμπληρωματικοί συγκεκριμένου τμήματος-DNA στόχου.¹²
- *Ευρέως φάσματος PCR*: Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί συντηρημένων περιοχών

γονιδιώματος κοινών για κάθε ταξινομική ομάδα (βακτήρια/ ιούς).¹³

- *Πολλαπλή PCR*: χρησιμοποιείται πάνω από 1 ζεύγος εκκινητών, με σκοπό τον σύγχρονο πολλαπλασιασμό πολλαπλών περιοχών του γονιδιώματος.⁵
- *Nested PCR*: Το εμφωλεαζόμενο PCR χρησιμοποιεί το προϊόν μίας αρχικής PCR αντίδρασης ως εκμαγείο σε δεύτερη PCR. Χρησιμοποιείται όταν το DNA/RNA βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα ή είναι αποικοδομημένο που συνήθως ισχύει για διατηρημένο ιστό. Προσφέρει μεγαλύτερη ειδικότητα και αυξημένη ευαισθησία αλλά υπάρχει και αυξημένος κίνδυνος επιμόλυνσης.⁷
- *PCR αντίστροφης μεταγραφάσης*: Οι εκκινητές πολλαπλασιάζουν περιοχές mRNA (περιοχές εξονίων ή μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδιώματος) με σκοπό τη παραγωγή cDNA (complementary DNA). Χρησιμοποιείται στις μελέτες έκφρασης γονιδίων.¹⁴
- *Real-Time & ποσοτική Real-Time*: παρέχει τη δυνατότητα φθορισμομετρικής παρακολούθησης της συσσώρευσης του προϊόντος και προσφέρει ποσοτικοποίηση του DNA/cDNA. Είναι μια ταχεία μέθοδος με ελαχιστοποίηση χειρισμού των δειγμάτων και ως εκ τούτου περιορισμό της πιθανότητας επιμόλυνσης. Χρησιμοποιείται κυρίως στην ποσοτικοποίηση DNA/RNA αλλά λόγω της ταχύτητάς της και στην άμεση ανίχνευση μεταλλάξεων στην ΠΓΔ.¹⁵

Μέθοδοι βασιζόμενοι στην PCR

Άμεσος τρόπος ανίχνευσης μεταλλάξεων

Η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άμεση ανίχνευση μεταλλάξεων/SNPs όταν πρόκειται για γνωστές μεταλλάξεις και οι μεθοδολογίες ανίχνευσης είναι:

1. *Allele specific oligonucleotide - ASO*

Υβριδισμός του προϊόντος της PCR με ολιγονουκλεοτίδια απολύτως συμπληρωματικά με την προς ανίχνευση αλληλουχία. Παρασκευάζονται 2 ολιγονουκλεοτίδια για κάθε μετάλλαξη, ένα συμπληρωματικό με την φυσιολογική και ένα με τη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Τα ολιγονουκλεοτίδια ή το προϊόν PCR είναι σημασμένα με ραδιενεργό ουσία ή με βιοτίνη. Αρκετά έτοιμα αντιδραστήρια (kit) που κυκλοφορούν στην αγορά έχουν τα ολιγονουκλεοτίδια σε μεμβράνες στις οποίες υβριδίζεται το PCR προϊόν και η ταυτοποίηση της μετάλλαξης γίνεται με την αντίδραση βιοτίνης/στρεπταβιδίνης. Το απολύτως συμπληρωματικό προϊόν θα δώσει θετική ταίνια.¹⁶

2. *Amplification Refractory Mutation System (ARMS)*

Αποτελεί παραλλαγή της PCR αντίδρασης. Βασίζεται στην διαφοροποιημένη αποδοτικότητα επιμήκυνσης των υβριδισμένων εκκινητών όταν το νουκλεοτίδιο στο 3' του εκκινητή είναι συμπληρωματικό ή μη ως προς τη θέση που εξετάζεται.¹⁶

3. *Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων*

Τα περιοριστικά ένζυμα ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων με μήκος συνήθως από 4-6 βάσεις. Αρκετές σημειακές μεταλλάξεις δημιουργούν ή καταστρέφουν θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων. Το προϊόν της αντίδρασης PCR κόβεται με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο και η παρουσία ή απουσία της μετάλλαξης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε γέλη αгарόζης.

4. *GAP PCR (για γνωστά ελλείμματα)*

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεγάλων ελλειμμάτων μόνο όταν η αλληλουχία του DNA στα όρια του ελλείμματος είναι γνωστή και έχει ως εκ τούτου τη δυνατότητα

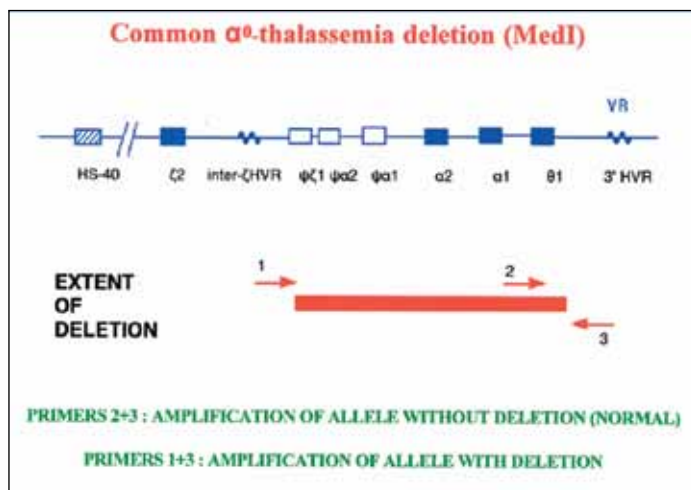
αντικατάστασης της τεχνικής “southern blotting”. Συντίθενται δύο εκκινητές συμπληρωματικοί της αλληλουχίας στα όρια του ελλείμματος και ένας τρίτος συμπληρωματικός μιας αλληλουχίας που γειτνιάζει στο έλλειμμα και βρίσκεται εντός του ελλείμματος. Η PCR επομένως περιλαμβάνει 3 εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε γέλη αгарόζης για άμεση επισκόπηση του αποτελέσματος. Η ύπαρξη του ελλείμματος σε ετεροζυγώτη θα δώσει προϊόν από το ζεύγος εκκινητών που βρίσκονται στα όρια του ελλείμματος και προϊόν με το ζεύγος ενός εκκινητή στα όρια του ελλείμματος και του εκκινητή εντός της περιοχής του ελλείμματος (Εικόνα 2).¹⁷

Έμμεσος τρόπος ανίχνευσης μεταλλάξεων

Ο έμμεσος τρόπος ανίχνευσης μεταλλάξεων χρησιμοποιείται κυρίως για σάρωση (scanning) κωδικοποιουσών περιοχών γονιδίων όταν δεν είναι ταυτοποιημένες οι μεταλλάξεις ή μεγάλων γονιδίων των οποίων τα εξόνια περιέχουν πολλαπλές μεταλλάξεις (γονίδιο κυστικής ίνωσης). Συνήθως επιβάλλεται η ταυτοποίηση της μετάλλαξης με μία 2^η μεθοδολογία, όπως αυτές που έχουν περιγραφεί παραπάνω ή με ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA- Sequencing. Εάν στη γέλη πολυακρυαμίδης έχουν συμπεριληφθεί αρκετοί μάρτυρες γνωστών μεταλλάξεων που δίνουν γνωστό ηλεκτροφορητικό πρότυπο, η 2^η μεθοδολογία δεν είναι απαραίτητη. Η τεχνική με την μεγαλύτερη ακρίβεια σε αυτή την ομάδα είναι η ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυαμίδης με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)- και οι πιο αυτοματοποιημένες μεθοδολογίες – Αποδιατακτική Χρωματογραφία Υγρής Φάσης (Denaturing High Performance Liquid Chromatography – DHPLC) και High Resolution DNA Melting Curve Analysis που στηρίζονται στην ίδια λογική με το DGGE.

1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Η μέθοδος DGGE αρχικά περιγράφηκε το 1989. Είναι μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (αντικατάσταση, έλλειμμα ή προσθήκη βάσεων στην αλληλουχία του DNA). Βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της GAP-PCR.

τμημάτων διπλής έλικας DNA μετά από πολλαπλασιασμό με PCR, σε πήκτωμα πολυακρυαμίδης που περιέχει αποδιατακτικούς παράγοντες σε προοδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση. Ο διαχωρισμός των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων τμημάτων DNA βασίζεται στα χαρακτηριστικά τήξεως του μορίου του DNA. Το μόριο του DNA, αποτελείται από δύο συμπληρωματικές αλυσίδες που μπορούν να διαχωρίζο-

νται (τήκονται) όχι μόνο σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας αλλά και υπό την επίδραση συγκεκριμένων χημικών αποδιατακτικών ουσιών.

Κατά μήκος ενός μορίου DNA (ιδανικά από 100-300 ζβ) η τήξη θα γίνει σε συγκεκριμένα τμήματα όσο αυξάνεται η θερμοκρασία ή η συγκέντρωση του χημικού αποδιατακτικού. Τα τμήματα αυτά, που ονομάζονται «κύριες περιοχές» (Domains) διαφέρουν μεταξύ τους σε μήκος από 25 έως μερικές εκατοντάδες ζβ και κάθε ένα από αυτά τήκεται σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία που ονομάζεται θερμοκρασία τήξεως (T_m). Η T_m μιας «κύριας περιοχής» εξαρτάται στενά από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και αλλάζει σημαντικά με την αντικατάσταση έστω και μιας μόνο βάσης.

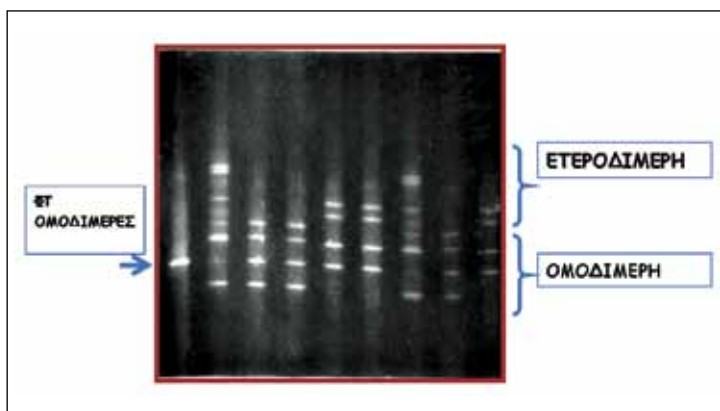
Κατά την ηλεκτροφόρηση ενός τμήματος DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με σταδιακά αυξανόμενη (από την κορυφή προς τη βάση) συγκέντρωση χημικού αποδιατακτικού, όταν αυτό εισέρχεται στη συγκέντρωση του αποδιατακτικού –όπου τήκεται η «κύρια περιοχή» με την χαμηλότερη θερμοκρασία τήξεως– η περιοχή «ανοίγει» σχηματίζοντας ένα μόριο DNA με διακλαδιζόμενη δομή το οποίο κινείται στο πήκτωμα πολύ αργά - σχεδόν ακινητοποιείται. Εάν το δείγμα DNA σε αυτή την «κύρια περιοχή» περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη, η θερμοκρασία τήξης του θα διαφέρει και το μόριο του DNA θα έχει μια εντελώς διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα συγκρινόμενο με το δείγμα-μάρτυρα.

Η μέθοδος DGGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ακόμα και διαφορών μίας βάσης, σε όλα τα τμήματα του μορίου του DNA εκτός από εκείνο με την υψηλότερη θερμοκρασία τήξεως. Αυτό το μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί αν κατά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού του DNA προστεθούν περιοχές πλούσιες σε GC βάσεις (GC clamps: 30-60 ζβ) στο 5' άκρο του ενός εκ του ζεύγους των εκκινητών. Το τμήμα αυτό θα έχει ένα πάρα πολύ υψηλό T_m και το υπόλοιπο τμήμα DNA θα έχει ένα μοναδικό και χαμηλότερο T_m συγκριτικά με αυτό. Έτσι είναι δυνατή η ανίχνευση κάθε αλλαγής νουκλεοτιδίου στο μόριο του DNA.

Εάν ένα δείγμα DNA είναι ετερόζυγο για μια σημειακή μετάλλαξη η αντίδραση PCR δημιουργεί ένα μείγμα από διπλές έλικες-μόρια. Ορισμένα μόρια από αυτά είναι ομοδιμερή, δηλαδή ομόλογες διπλές έλικες (homoduplexes) είτε για την φυσιολογική είτε για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία που μεταναστεύουν ταχύτερα στο πήκτωμα, ενώ υπάρχουν επιπλέον και δυο είδη ετεροδιμερών μορίων (μη ομόλογες διπλές έλικες (heteroduplexes) που μετακινούνται βραδύτερα) και έτσι αναμένεται η παρουσία μέχρι 4 ταινιών στο πήκτωμα (Εικόνα 3).

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται συγκρινόμενα με φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα-μάρτυρες που συμπεριλαμβάνονται σε κάθε ηλεκτροφόρηση DGGE.

Η μέθοδος DGGE είναι η πλέον κατάλληλη για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών



Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά από PCR σε γέλη πολυακρυλαμίδης DGGE για την ανίχνευση μεταλλάξεων.

σε όλα τα εξόνια του γονιδίου της κυστικής ίνωσης, όπως έχει περιγραφεί από τους Fanen και συν. (1992). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος που χρησιμοποιείται έχει περιγραφεί από τους Attree και συν. (1989). Ποσότητα 15μl από το κάθε πολλαπλασιασμένο τμήμα DNA υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση στα 75-200V για 4-18 ώρες, σε πήκτωμα 6.5% πολυακρυλαμίδης που περιέχει γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικής ουσίας (100% αποδιατακτικής ουσίας είναι 7M ουρίας και 40% φορμαμίδης), σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.⁵

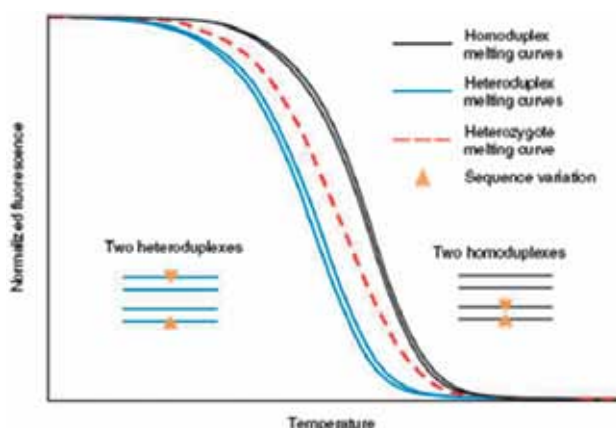
2. Αποδιατακτική Χρωματογραφία Υγρής Φάσης (Denaturing high performance liquid chromatography – DHPLC)

Πρόκειται για ένα εξαιρετικά αξιόπιστο σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων που είναι συγχρόνως γρήγορο δεδομένου ότι μπορεί να πραγματοποιήσει τον έλεγχο ενός δείγματος σε 6 min. Ως εκ τούτου στη διάρκεια ενός 24ώρου μπορεί να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος περίπου 240 δειγμάτων.

Ο εντοπισμός των μεταλλάξεων πραγματοποιείται μέσω της ανίχνευσης ετεροδιμερών που δημιουργούνται λόγω μη συμπληρωματικών βάσεων στο υπό μελέτη τμήμα του DNA. Η ευαισθησία της ανίχνευσης μεταλλάξεων και η ακρίβεια του αποτελέσματος αγγίζει το 100%, ενώ η ελάχιστη ποσότητα των αντιδραστηρίων και το χαμηλό κόστος τους σε συνδυασμό με την αποφυγή χρήσης επικίνδυνων χημικών ουσιών καθιστούν τη μέθοδο αυτή μια από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές μοριακού ελέγχου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της εφαρμογής του DHPLC αποτελεί η ανίχνευση μεταλλάξεων στα 2 γονίδια που ενέχονται στο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, BRCA1 και BRCA2.^{18, 19}

3. LightScanner® System (Post-PCR Hi-Res Melting™ system)

Σύστημα ταχείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης σημειακών μεταλλαγών (SNP Genotyping) με ανάλυση της αλληλουχίας του προϊόντος της PCR. Η τεχνολογία του συστήματος βασίζεται στην μελέτη της καμπύλης του σημείου τήξης των προϊόντων PCR (Melting curve Analysis) και τη χρήση ειδικών φθορίζοντων χρωστικών ή ανιχνευτών (Dye/probes) επιτρέποντας στον χρήστη να επεξεργαστεί μεγάλο αριθμό δειγμάτων στην μονάδα του χρόνου. Με τη βοήθεια του λογισμικού του συστήματος σχεδιάζονται ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για τον πολλαπλασιασμό με PCR. Η θερμική σταθερότητα κάθε δίκλωνου τμήματος DNA μετά από αντίδραση PCR, εξαρτάται από την αλληλουχία των βάσεων. Όταν λόγω κάποιας μονονουκλεοτιδικής αλλαγής η αλληλουχία διαφέρει της φυσιολογικής, η σταθερότητα του μορίου αλλάζει και ως εκ τούτου και η καμπύλη αποδιάταξης. Όταν η αλλαγή βρίσκεται σε ομόζυγο κατάσταση (ίδια αλληλουχία και στα 2 αλληλόμορφα) τότε παρατηρείται μία αρκετά δραστική αλλαγή στην καμπύλη αποδιάταξης σε σχέση με το φυσιολογικό. Σε ένα δείγμα DNA ετερόζυγο για μια σημειακή μετάλλαξη η αντίδραση PCR δημιουργεί ένα μείγμα από διπλές έλικες-μόρια. Ορισμένα μόρια από αυτά είναι ομοδιμερή, δηλαδή ομόλογες διπλές έλικες (homoduplexes) είτε για την φυσιολογική είτε για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία, ενώ υπάρχουν επιπλέον και δυο είδη ετεροδιμερών μορίων, δηλαδή μη ομολόγων διπλών ελίκων (heteroduplexes) με διαφορετική καμπύλη αποδιάταξης, καθιστώντας εύκολη την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών (Εικόνα 4). Η τεχνολογία Post-PCR Hi-Res Melting™ εξυπηρετεί απόλυτα τις απαιτήσεις και την φιλοσοφία μίας σύγχρονης, ταχείας και αξιόπιστης τεχνικής και παρέχει δυνατότητα επεξεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων με τη χρήση 96 ή 384-πλακών (well plates). Η επιλογή χρήσης 384 θέσεων εξασφαλίζει την επεξεργασία περίπου 1,000 - 18,000 SNPs σε μια εργάσιμη μέρα με διαδικασία μιας ανάλυσης (run) η οποία διαρκεί περίπου 10 min. Διαθέτει υψηλή διακριτική ικανότητα και ευαισθησία ανίχνευσης. Τα προς μελέτη δείγματα υποβάλλονται στη διαδικασία της PCR σε οποιονδήποτε θερμικό κυκλοποιητή



Εικόνα 4. Καμπύλες αποδιάταξης με το αυτοματοποιημένο σύστημα Post-PCR Hi-Res Melting™ όπου διακρίνονται οι ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες μεταλλάξεων.

του γονιδίου που βρίσκεται υπό μελέτη. Βασίζεται στη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA ξεκινώντας από συγκεκριμένη θέση και σταματώντας με την ενσωμάτωση στην αλυσίδα ενός “νουκλεοτιδίου τερματισμού”, όπως είναι τα τριφωσφορικά δι-δεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα ddNTPs διαφέρουν από τα κανονικά τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) στο ότι δεν έχουν την ομάδα OH στο 3’ άκρο τους, οπότε κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, όταν προστεθεί ένα ddNTP σταματάει η σύνθεση στη συγκεκριμένη βάση, λόγω απουσίας ελεύθερης –OH ομάδα στο 3’ άκρο για να προστεθεί το επόμενο νουκλεοτίδιο (μέθοδος Sanger).

Με την αντίδραση PCR εκτελούνται δι-δεοξυνουκλεοτιδικές αντιδράσεις σε υπόστρωμα δίκλωνου πολλαπλασιασμένου DNA, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά μίας μικρής περιοχής του υποστρώματος DNA και σημασμένα στο 5’ άκρο τους με φθορίζουσα ουσία και αντιδραστηρίων προσδιορισμού αλληλουχίας DNA (dye-primer sequencing kit) που περιέχει μια ειδική θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Thermo sequenase DNA polymerase). Για κάθε δείγμα DNA γίνονται 4 αντιδράσεις σε διαφορετικά σωληνάκια, τα οποία περιέχουν διαφορετικό δι-δεοξυνουκλεοτίδιο ανάλογο των βάσεων A,C,G,T (ddATP,ddCTP,ddGTP,ddTTP).

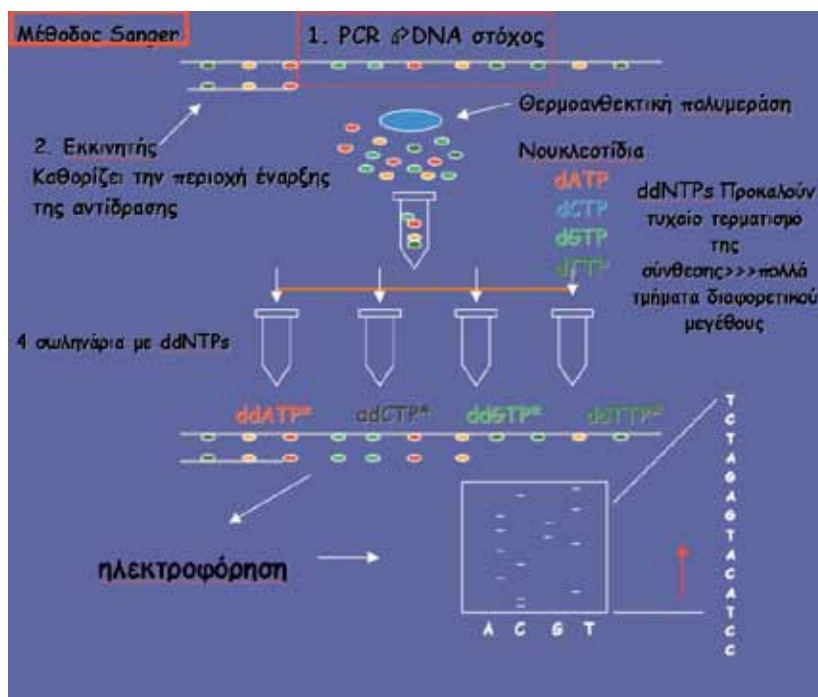
Αφού ολοκληρωθούν οι 4 αντιδράσεις, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε παράλληλες σειρές σε πήκτωμα 6% πολυακρυλαμίδης με ουρία ως χημικό αποδιατακτικό παράγοντα, σε συσκευή αυτόματου φθορίζοντα αναλυτή αλληλουχίας DNA. Οι αντιδράσεις sequencing δημιουργούν φθορίζοντα αντίγραφα του αρχικού υποστρώματος DNA τα οποία θα έχουν “σημεία τερματισμού” σε όλες τις θέσεις κατά μήκος της αλυσίδας. Η συλλογή και η επεξεργασία όλων των στοιχείων γίνεται χρησιμοποιώντας το λογισμικό του αυτόματου αναλυτή αλληλουχίας DNA (Εικόνα 5).

Η επιλογή κατάλληλης μεθοδολογίας για μοριακή διάγνωση εξαρτάται από τη συχνότητα του νοσήματος από το φάσμα μεταλλάξεων (αριθμός & συχνότητα) και την υποδομή και τεχνολογική πείρα του εργαστηρίου.^{22, 23}

με παρουσία ειδικής χρωστικής (LCGreen® Plus dye), και στην συνέχεια μεταφέρονται στο σύστημα LightScanner για ανάλυση.^{20, 21}

Προσδιορισμός αλληλουχίας πρωτοταγούς δομής τμημάτων DNA

Η μέθοδος Προσδιορισμού αλληλουχίας πρωτοταγούς δομής τμημάτων DNA (DNA Sequencing - Μέθοδος Sanger) επιτρέπει την ακριβή ανάλυση και αναγνώριση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου ή μίας περιοχής



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του Προσδιορισμού της αλληλουχίας της πρωτοταγούς δομής τμημάτων DNA (DNA Sequencing- Μέθοδος Sanger).

Αντιμετώπιση των προβλημάτων που συνδέονται με τον πολλαπλασιασμό του DNA

Η αντίδραση PCR αν δε γίνει σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο και από άτομα με την κατάλληλη εκπαίδευση παρουσιάζει προβλήματα τα οποία ακριβώς συνδέονται με την δυνατότητα της τεχνικής να πολλαπλασιάζει περιοχές του DNA ξεκινώντας από απειροελάχιστο υπόστρωμα. Τα κυριότερα προβλήματα της τεχνικής είναι:

- Αποτυχία πολλαπλασιασμού του DNA
- Αποτυχία πολλαπλασιασμού από το ένα αλληλόμορφο (allele drop out)
- Επιμόλυνση

Το κυριότερο πρόβλημα είναι η επιμόλυνση από ξένο DNA, για την αντιμετώπιση του οποίου χρειάζονται διαφορετικοί εργαστηριακοί χώροι για την εκχύλιση του DNA/RNA, στήσιμο της PCR, και επεξεργασία των προϊόντων της αντίδρασης καθώς και ειδικός εξοπλισμός όπως ξεχωριστές πιπέτες, ρύγχη με φίλτρα και συχνή ακτινοβόληση όλων των σκευών/αντικειμένων με UV.

Μελέτη αγγελιοφόρου RNA- mRNA, RT-PCR

Για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται ως αρχικό υλικό RNA αντί για DNA. Πρώτα γίνεται εκχύλιση του RNA από ιστό όπου εκφράζεται το υπό μελέτη γονίδιο (για την κυστική ίνωση μπορεί να χρησιμοποιηθούν επιθηλιακά κύτταρα ρινικού βλεννο-

γόνου). Ακολουθεί η σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφάση –reverse transcriptase PCR (RT-PCR)– με την βοήθεια εκκινητών. Σχεδιάζονται εκκινητές οι οποίοι εντοπίζονται σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου ικανοί να πολλαπλασιάσουν την υπό μελέτη περιοχή. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση καταστρέφει το mRNA και αντιγράφει συμπληρωματική έλικα cDNA.¹⁴

Οι μελέτες έκφρασης γονιδίων βοηθούν:

- στη ανάλυση του αποτελέσματος μεταλλάξεων ματίσματος
- στην ποσοτικοποίηση του mRNA (Real Time PCR)
- στην μελέτη διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε μικροσυστοιχίες (microarrays)

PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

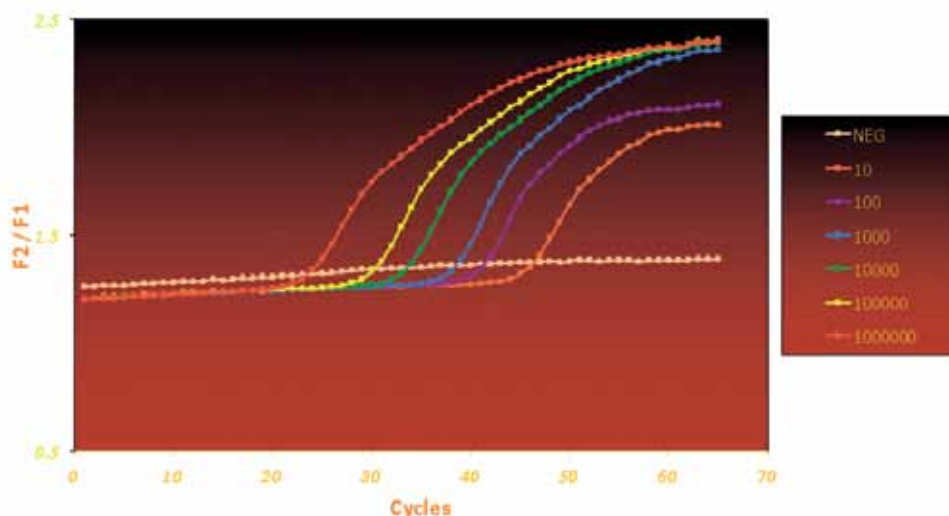
Είναι η διαδικασία πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA με την PCR και ταυτόχρονα ανίχνευση/ παρακολούθηση του παραγόμενου προϊόντος καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-Time PCR). Δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης ακόμη και διπλάσιας μεταβολής στη συγκέντρωση του προϊόντος. Η επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού γίνεται με ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης με τη βοήθεια του λογισμικού του συστήματος (Εικόνα 6).

Τα πλεονεκτήματα του Real-Time PCR είναι ότι η αντίδραση:

- δεν επηρεάζεται από μη ειδικό πολλαπλασιασμό
- ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο
- δεν χρειάζεται άλλη επεξεργασία των PCR προϊόντων για ανίχνευση της μετάλλαξης
- αποτελεί ταχεία μέθοδο (30 min)
- απαιτεί χρήση 1000-φορές λιγότερου RNA/DNA (3 picogram = one genome equivalent)

Εφαρμογές της Real-Time PCR

Η Real-Time PCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε μικρές ποσότητες DNA όπως στην εφαρμογή ΠΓΔ όπου ελέγχονται μεταλλάξεις σε 1 βλαστομερίδιο.



Εικόνα 6. Real-Time PCR καμπύλες ποσοτικοποίησης προϊόντος.

Χρησιμοποιείται επίσης στην ποσοτικοποίηση αντιγράφων γονιδίων (gene copy numbers), ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων, την επαλήθευση αποτελέσματος πειραμάτων μικρο-συστοιχειών (microarrays), ποσοτικοποίηση του φορτίου και στην ανίχνευση παθολογικού φορτίου μικροβίου.^{15, 24}

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Τα Εργαστήρια Μοριακής Γενετικής προσφέρουν μια ποικιλία διαγνωστικών εξετάσεων ανάλυσης DNA. Η άμεση ανάλυση των μεταλλάξεων είναι διαθέσιμη για πληθώρα γενετικών παθήσεων και καθιστά δυνατή την επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης σε πάσχοντες, την προσυμπτωματική διάγνωση σε άτομα υψηλού κινδύνου για συγκεκριμένο νόσημα, την ανίχνευση φορέων και την προγεννητική ή την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση. Για τα μονογονιδιακά νοσήματα όπου δεν είναι δυνατή η ανίχνευση μεταλλάξεων, χρησιμοποιούνται γενετικοί δείκτες ώστε να προβλεφθεί η κληρονομική μεταβίβαση. Είναι επίσης σημαντικό ότι δείγματα DNA μπορούν να συντηρηθούν για απεριόριστο χρονικό διάστημα και να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για την οικογένεια υψηλού κινδύνου. Οι σημερινές δυνατότητες αξιόπιστης ανάλυσης των γονιδίων κάθε ατόμου καθώς και οι αλματώδεις πρόοδοι της μοριακής γενετικής για την ανίχνευση μεταλλάξεων σχετικά γρήγορα και με ολοένα μικρότερο οικονομικό κόστος, δικαιολογούν τη διεύρυνση της μοριακής διαγνωστικής. Έτσι, μέσα στις υποχρεώσεις του κλινικού γιατρού είναι να κατευθύνει τις οικογένειες, με το γενετικό πρόβλημα στις κατάλληλες υπηρεσίες κλινικής και μοριακής γενετικής ώστε εγκαίρως και υπεύθυνα να ενημερώνονται για τις δυνατότητες που μπορούν να τους προσφερθούν στα πλαίσια της μοριακής διάγνωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
2. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-61.
3. Abramson R. Thermostable DNA polymerases. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, eds. *PCR strategies*, San Diego: Academic Press; 1995. p. 39-55.
4. Bej AL, Mahbubani MH. Thermostable DNA polymerases for in vitro DNA amplifications. In: Griffin HG, Griffin AM, eds. *PCR technology: Current innovations*, Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p. 219-237.
5. Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic Fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 2003; 63: 400-409.
6. Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadis Th, Pistofidis G, Milligos S, Kattamis C. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligospermia. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 333-337.
7. Kokkali GJ, Traeger-Synodinos C, Vrettou D, Stavrou GM, Jones DS, Cram E, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of β -thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 2007; 22: 1443-1449.
8. Liu KT, Su WJ, Perng RP. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *J Chin Med Assoc* 2007; 70: 148-151.
9. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 2216-2220.

10. Prichard MN, Daily SL, Jefferson GM, Perry AL, Kern ER. A rapid DNA hybridization assay for the evaluation of antiviral compounds against Epstein-Barr virus. *J Virol Methods* 2007; 144: 86-90.
11. Redon, R. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-454.
12. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
13. Strick LB, Wald A. Diagnostics for herpes simplex virus: is PCR the new gold standard? *Mol Diagn Ther* 2006; 10: 17-28.
14. Ramalho AS, Beck S, Farinha CM, Clarke LA, Heda GD, Steiner B, et al. Methods for RNA extraction, cDNA preparation and analysis of CFTR transcripts. *J Cyst Fibros* 2004; 3(Suppl 2): 11-15.
15. Caliendo AM, Ingersoll J, Fox-Canale AM, Pargman S, Bythwood T, Hayden MK, et al. Evaluation of Real-Time PCR Laboratory Developed Tests using Analyte Specific Reagents (ASRs) for the Quantification of Cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1723-1727.
16. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 523-528.
17. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Tzetis M, Kattamis A, Kattamis C. Characterization of nondeletion alpha-thalassemia mutations in the Greek population. *Am J Hematol.* 1993; 44: 162-167.
18. Konstantopoulou I, Rampias T, Ladopoulou A, Koutsodontis G, Armaou S, Anagnostopoulos T, et al. Greek BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum: two BRCA1 mutations account for half the carriers found among high-risk breast/ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 107: 431-441.
19. Lim KS, Naviaux RK, Haas RH. Quantitative mitochondrial DNA mutation analysis by denaturing HPLC. *Clin Chem* 2007; 53: 1046-1052.
20. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simoultaneous mutation scanning & genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols* 2007; 2: 59-66.
21. Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L. Scanning the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem* 2007; 53: 11-18.
22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 5463-5467.
23. Maxam, A.M. and W. Gilbert. A new method for sequencing DNA *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 560-564.
24. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem.* 2003; 49: 769-776.