
Att påvisa astmatisk inflammation med undersökning av sputum

Tari Haahtela, Tuula Metso ja Paula Rytölä

Läkarna har nästan helt saknat metoder för att rutinmässigt kunna diagnostisera slemhinneinflammation i andingsvägarna. Astma är en inflammatorisk sjukdom i luftrören, men i praktiken diagnostiseras och följs inflammationen inte upp. Undersökningar av sputum har använts länge men har de senaste åren utvecklats för att påvisa den för astma typiska eosinofila inflammationen på ett tidigt stadium. Det är ändamålsenligt att undersöka sputum hos patienter som lider av utdragen hosta: bestämning av inflammationsceller och mätning av inflammationsmarkörer röjer inflammationens art och leder till rätt behandling.

Redan vid lindrig astma är slemhinnan inflammationerad och flimmerepitelet något skadat. Vid astma är det typiskt att eosinofila leukocyter ackumuleras i epitelet och de underliggande vävnaderna. I kroniska fall ses förändringar i slemhinnans struktur: basalmembranen förtjockas, bindväv bildas under epitelet, glattmuskelskiktet förtjockas och kapillärer nybildas. Strukturförändringen kan göra luftrören stelare och försämrar hos en del patienter lungfunktionen irreversibelt.

Utdragen hosta, slembildning, andnöd och ibland pipande andning är kliniska symtom på astma. Rubbad lungfunktion, som traditionellt varit grunden för diagnostiken av astma, är en följd av slemhinneinflammationen. När astmainflammationen är i en aktiv fas innehåller slemhinnan rikligt med eosinofila leukocyter. I slemhinneprovbiter som tagits vid bronkoskopi ses inflammationsförändringar redan på ett tidigt stadium av astma, när sjukdomen ännu inte framskridit så långt att funktionen rubbas bestående. Det är uppenbart att slemhinnan drabbas av inflammation redan innan funktionsrubbing utvecklas.

Astmainflammationen borde avslöjas redan när sjukdomen är lindrig och funktionsrubbing ännu inte regelbundet förekommer. Att undersöka ett inducerat sputumprov är ett

”nytt” sätt att påvisa slemhinneinflammation noninvasivt. Med hjälp av sådant kan även effekten av inflammationslindrande behandling vid astma följas upp. I ett sputumprov som härstammar från de nedre luftvägarna kan man vid inflammation påvisa celler mikroskopiskt och mäta markörer som frisätts av aktiverade inflammationsceller.

Bakgrund

Sputumundersökningar har sedan urminnes tider utnyttjats av lungläkare t.ex. för att påvisa tuberkulosbakterier och maligna celler vid cancermisstanke. Vid astma väcktes intresset för sputumundersökningar när det konstaterats att epitelskador och inflammationsförändringar förekommer redan på ett

FÖRFATTARNA

Docent Teri Haahtela är specialist i lungsjukdomar och allergologi och överläkare vid Hud- och allergisjukhuset vid HUCS. Fil. lic. Tuula Metso är sjukhuskemist och med. lic. Paula Rytölä sjukhusläkare vid samma klinik.

Tabell 1. Anvisning för induktion av sputum

1. Före induktionen inhalerar patienten 200 µg salbutamol. Efter tio minuter mäts PEF-värdet tre gånger och det bästa värdet noteras. Om PEF-värdet är under 300 l/min, startas induktionen bara under läkartillsyn. Patienten informeras om undersökningens syfte och undervisas i rätt hostteknik (provet skall komma upp ur de nedre luftvägarna). Munnen sköljs och näsan snyts.
 2. I läkemedelsbehållaren på en Omron U1-ultraljudsnebulisator (Omron, Tyskland, representant NormoMedical) hälls 5 ml steril 3 % koksaltlösning. Patienten inandas lugnt koksaltlösning utan näsklämma i cirka 15 minuter. Andningen avbryts genast om patienten börjar hosta så att sputum kan tas till vara. Patienten skall inte lämnas ensam under induktionen.
 3. Allt sputum tas till vara i en steril kopp. Ett bra sputumprov innehåller material från de nedre luftvägarna. Enbart saliv duger inte.
 4. Induktionen avbryts när man fått tillräckligt mycket sputumprov, 15 minuter förlöpt eller koksaltlösningen tagit slut. Om patienten får andnöd eller andra symtom avbryts induktionen.
 5. Slutligen mäts PEF-värdet tre gånger, och om det sjunkit mer än 15 procent från utgångsvärdet ges patienten luftrörsvidgande medicin (t.ex. 200 µg Buventol Easyhaler®).
 6. Sputumprovet förvaras i kylskåp och behandlas så fort som möjligt, helst inom två timmar.
-

tidigt stadium av sjukdomen. På 1990-talet har metoderna att behandla och analysera prov av sputum utvecklats och visat sig vara tillräckligt pålitliga och reproducerbara.

Induktion av prov

Vid induktion av sputum används en ultraljudsaerosol och lätt hyperton saltlösning. I anvisningen i Tabell 1 har man använt en Omron U1-ultraljudsnebulisator (Omron, Tyskland, representant i Finland NormoMedical) samt treprocentig koksaltlösning. Före induktionen får patienten bronkutvidgande läkemedel (t.ex. Buventol Easyhaler® 200 µg) eftersom induktionen kan orsaka lindrig bronkokonstriktion. Utandningens peak flow (PEF) mäts före och efter induktionen. Detta tillvägagångssätt är helt riskfritt för patienten. Med lite övning kan 90 procent av patienterna och friska kontrollpersoner ge ett bra sputumprov från de nedre luftvägarna.

Behandling av sputumprov

En enkel metod som lämpar sig för rutinanalyser för att bestämma koncentrationer av inflammationsmarkörer i sputumprov beskrivs i Tabell 2.

Behandling av prov i primärvården

Ett sputumprov kan förvaras i kylskåp ett par timmar innan det behandlas. Detta hindrar bakterieaktivitet och sputumcellerna bevaras hela och sönderfaller inte. Sputum separeras från saliven i provet med pincett. Sputum-

klumparna sammanförs och rörs om med pincett, och en del används för utstryksglas. Lufttorkade glas är hållbara i rumstemperatur en vecka utan att cellernas morfologi lider. Resten av sputumprovet läggs i frys (-20°C) för att vänta på transport till laboratoriet.

Behandling av prov på laboratoriet

Det krävs att sputumprovet är representativt material från de nedre luftvägarna. Ett bra sputumprov innehåller mycket makrofager och lite epitelceller från slemhinnan. Att provet är representativt kontrolleras genom att de obehandlade utstryksglasen färgas med eosin-metylenblått och studeras i mikroskop. Differentialräkning av cellerna i sputum kan inte göras på utstrykspreparat, utan de olika cellernas andelar uppskattas semikvantitativt.

De klumpar som separerats ur sputumprovet behandlas med slemupplösande ämnen (Sputolysin®) som likvifierar provet. Därefter behandlas provet med cellupplösande reagens (detergens), vilket frigör intracellulära markörer som kan mätas.

Om man vill undersöka inflammationscellernas procentuella andelar i sputumprovet (differentialräkning) kan provet inte djupfrysas i väntan på analys. Det likvifieras med Sputolysin, men cellerna upplöses inte med detergens. Med cytocentrifug görs ett preparat som färgas med MGG (May-Grünwald-Giemsa) och cellerna räknas mikroskopiskt. Differentialräkning av sputumceller är en relativt arbetskrävande metod och lämpar

Tabell 2. *Behandling av inducerat sputumprov i rutinanalys. Punkterna 1–4 i den öppna vården, 5–7 i laboratorium*

1. Det inducerade sputumprovet samlas i en tom sputumburk. Konserveringsmedel (t.ex. etanol) får inte användas.
2. Sputumprovet hålls ut på en petriskål av plast, och med pincett plockas sputumklumparna ut ur saliven. Saliv och sputum kan särskiljas med hjälp av färgen och viskositeten. Saliven är en klar, nästan genomskinlig vätska. Sputum varierar till färgen från olika grader av ljust till helt klart, men kan även vara grönt, gult eller brunt. Sputum är segare än saliv och dess viskositet är högre än salivens.
3. Att provet är representativt kontrolleras genom att utstryk med tvåglasteknik görs av en del av det sputum som finns provet. Preparatet lufttorkas och fixeras inte.
4. Resten av provet sätts i ett provrör, vägs och djupfrysas.
5. Utstrykspreparatet färgas med metylenblått, och de färgade cellerna studeras i ljusmikroskop. För vidare behandling duger prov som innehåller makrofager och/eller bronkepitelceller med flimmerhår.
6. Provet tinas upp för behandling. I provröret tillsätts slemupplösande reagens (10 % Sputolysin utspädd i vatten, CalbioChem, USA) fyrfaldig volym ($4 \times A \mu\text{l}$) jämfört med mängden sputum (A mg).
7. I provröret tillsätts CTAB-reagens (0,4 % CTAB¹, 0,25 % HSA² i PBS-buffert³ pH 7,2) femfaldig volym ($5 \times A \mu\text{l}$) jämfört med mängden sputum (A mg). Provet blandas 15 minuter med en cellblandare.
8. Provet centrifugeras (10 minuter, 1 800 g, rumstemperatur). Klar supernatant tas till vara och fördelas på två provrör. Resten av provet (cellknappen) slängs.
9. I supernatanten bestäms inflammationsmarkörerna. ECP- och MPO-bestämningarna görs med kommersiella reagenser (Pharmacia & Upjohn Diagnostics, Uppsala, Sverige). Provet späds vid behov ut med provbuffert.

¹CTAB; cetyl-*N,N,N*-trimetylammoniumbromid. ²HSA; humant serumalbumin. ³PBS; 100 mM fosfatbuffrad koksaltlösning.

sig därför bara för specialistsjukvården och större laboratorier.

Undersökning av provet

Eosinofila leukocyter

Flera olika proteiner som inflammationscellerna utsöndrat kan bestämmas i provet med immunologiska metoder sedan de isolerade sputumklumparna behandlats och proteinerna gjorts lösliga. Vid astmaundersökningar är substanser som eosinofilerna utsöndrat de viktigaste. Även neutrofilspecifika proteiner behövs, eftersom neutrofil slemhinneinflammation ofta förekommer vid förvärrad astma, kronisk obstruktiv lungsjukdom (COPD) samt luftvägsinfektioner.

De eosinofila leukocyterna syntetiserar i sina granula flera specifika inflammationsproteiner, av vilka de mest undersökta är eosinofilernas katjoniska protein (ECP), eosinofilernas peroxidase (EPO), eosinofilernas protein X (EPX) och major basic protein (MBP). När cellen aktiverats, utsöndrar den dessa substanser som ofta är skadliga för luftvägsepitetet. Enligt den aktuella uppfattningen har slemhinneskadorna hos astmapatienter till stor del orsakats av eosinofila proteiner.

Av de eosinofila proteinerna känner man bäst till ECP som är ett intracellulärt basiskt

protein i granula. Det är toxiskt för parasitmaskarnas larver och bakterier och orsakar cellskador. Bestämning av ECP i serum har i stor utsträckning använts i diagnostiken av astma och svaret på behandlingen. Den eosinofila inflammationsreaktionen vid astma ses dock svagt i serum i lindriga faser eller begynnelsestadiet av sjukdomen, och förändringarna vid behandling är små. ECP-koncentrationen i sputum är mycket större än i serum, och den reagerar lätt på antiinflammatorisk behandling som påverkar den eosinofila inflammationen. I en studie av barnastmatiker korrelerade förändringarna i ECP-koncentration i sputum väl med patienternas symptom och lungfunktionsförändringar.

Neutrofila leukocyter

Neutrofila leukocyters andel i uppkomsten av astma är oklar. Vid inflammation i lungepitelet lockar aktiverade celler med kemotaktiska faktorer neutrofiler till stället och aktiverar även andra celler att utsöndra kemotaxiner. Neutrofilerna har i sitt cytoplasma flera specialiserade populationer av granula, som innehåller mikrobödande substanser, såsom myeloperoxidase, lipokalin, lysozym, elastas och laktoferrin. Till följd av cellaktiveringen frisätts dessa utanför cellen. Vid fagocytos frisätts de intracellulärt och förstör den fagocyterade substansen. I den aktiva fasen av

sjukdomen kommer dessa substanser även ut i den omgivande vävnaden.

Om det förekommer rikligt med neutrofiler i lungepitelet, djupare i slemhinnorna och i sputum återspeglar detta avancerad inflammation. Enstaka neutrofiler i lungepitel och i sputum är ett normalt fenomen.

Myeloperoxidas (MPO) är det mest undersökta av proteinerna i primärgranula eftersom det förekommer även i monocytter. MPO frisätts i anslutning till fagocytos och cellaktivering, varvid det katalyserar oxidering. Det uppkomna MPO-väteperoxid-halid-komplexet är toxiskt för de flesta mikroorganismer, men mikrobdöden är även förenad med en inflammationsreaktion. Stegrat MPO-värde i sputum vittnar om aktivering av neutrofiler och tyder på aktuell luftvägsinfektion eller förvärrad astma. MPO-värdet i serum ligger nästan undantagslöst inom referensområdet hos astmatikerna, förutsatt att de inte samtidigt har en luftvägsinfektion.

Övriga inflammationsceller i sputum

En central roll vid allergiska reaktioner innehas av vävnadsmastceller eller basofiler. Mastcellernas andel i inducerade sputumprov är liten, hos astmatiker maximalt cirka två procent. Histamin och tryptas är mastcellsspecifika substanser som kan mätas i sputum. För tillfället kan tryptas- och histaminbestämningar i sputum inte utnyttjas i astmadiagnostiken, eftersom koncentrationerna ligger under mätmetodens känslighet.

Lymfocyter finns bara sparsamt i sputum, och cellspecifika markörer har än så länge inte använts i rutindiagnostiken. T-helpercellernas interleukin-5 (IL-5) är en viktig tillväxtfaktor för eosinofiler och B-celler. När astma förvärras ökar IL-5-halterna i sputum till mätbara nivåer, medan steroidbehandling sänker halterna. För närvarande hör cytokinbestämningar inte till standardundersökningarna.

Sputumundersökning i kliniskt bruk

Inducerat sputum är det enda direkta sättet att icke-invasivt karakterisera inflammation i luftvägarna. Även mätning av utandningsluftens kväveoxid påvisar inflammation i luftvägarna men talar inte om vilken typ av inflammation det är frågan om.

Induktion av sputum kan även bra göras på barn från fem år uppåt. I standarddiagnostiken lönar det sig för närvarande att semikvantitativt bestämma inflammationscel-

lerna i utstrykspreparat och mäta ECP, en markör som reflekterar aktivering av eosinofilerna, och i samma prov också MOP, en markör för neutrofiler. Hos astmatikerna motsvarar eosinofila leukocyter och ECP-halter väl varandra. Fördelen med att mäta markörer jämfört med cellräkning är att man får ett objektiva talvärde, som kan jämföras med referensvärden och vars förändringar kan följas under behandling.

Metoden kan tillämpas även i den öppna värden. Prov kan tas t.ex. på hälsocentraler och skickas till laboratorium för undersökning. Läkare i primärvården får ofta lov att gissa om en hostande patient har bakterieinfektion (behandling kanske med antibiotika) eller virusinfektion (behandling vila och varm dryck) eller inflammation av astma eller allergi (behandling t.ex. med inhalationssteroid). Sputumundersökningar kan vara till hjälp i när det gäller att skilja mellan infektion och allergisk inflammation, men än så länge inte när det gäller att särskilja bakterie- och virusinfektioner.

En eosinofil inflammation kan lugna sig spontant så småningom – i synnerhet om orsaken är exponering för allergener, och exponeringen upphör. Men i behandlingen med läkemedel har man ingen nytta av upprepade antibiotikakurer, hostmediciner, "slemlösande" eller luftrörsutvidgande medel, utan inflammationen borde behandlas med antiinflammatoriska medel. Den rätta behandlingen för patienter med astmaliknande inflammationer är närmast inhalationssteroider som kurer (t.ex. i tre månader). Sputumundersökningarna har öppnat en möjlighet att diagnostisera dessa patienters sjukdom och erbjuda en bättre behandling.

Vid astma och dess förvärrade stadier ses ofta även aktivering av neutrofiler. En kraftig infektion (t.ex. lungklamydia) kan sätta i gång en eosinofil inflammationsreaktion, och då ordineras både antibiotika och steroider. Även COPD-patienter har rikligt med neutrofiler i sitt sputum. När man mäter en neutrofilmarkör, myeloperoxidas (MPO), samtidigt som ECP kan neutrofilernas andel uppskattas (Tabell 3). Hos friska människor ser man kraftig sputumneutrofil samt stegrade MPO- och ECP-halter vid luftvägsinfektioner. Neutrofilerna kan ta upp ECP i sig, lagra det i sina granula och vid aktivering frisätta det igen utanför cellen. ECP-halten kan vara hög i sputum när det förutom eosinofiler innehåller också neutrofiler. Därför måste man bestämma ECP och MPO sam-

Tabell 3. *Tolkning av resultaten*¹

	ECP i sputum ²	MPO i sputum ²	Diagnos
1.	Stegrat	Normalt	Astma eller astmaliknande inflammation
2.	Stegrat	Stegrat	Astma, astmaliknande inflammation, luftvägsinfektion
3.	Normalt	Stegrat	Luftvägsinfektion
4.	Normalt	Normalt	Normalt fynd

1. ECP förhöjt och MPO normalt. Resultatet tyder på eosinofil aktivering som kan vara förknippad med astma eller astmaliknande inflammation i luftvägarna. Om patienten har lungfunktionsförändringar (varierande obstruktion) stöder fyndet diagnosen astma.
2. ECP förhöjt och MPO förhöjt. Resultatet kan vara förenligt med förvärrad astma men det kan även vara frågan om enbart luftvägsinfektion. Om utstryket företer eosinofiler stöder fyndet diagnosen astma.
3. ECP normalt och MPO förhöjt. Resultatet tyder på luftvägsinfektion.
4. ECP normalt och MPO normalt. Om provet är bra (makrofager på glaset) är resultatet normalt. Om cellerna på glaset är bara skivepitelceller är det frågan om salivprov och resultatet är otillförlitligt.

¹Metso T, Ryttilä P, Haahtela T. Hud- och allergisjukhuset, HUUS. (Opublicerat material/Nordiska kongressen i klinisk kemi, Åbo 1998). ²Referensvärden: Ex-ECP-total under 2 500 µg/l (n = 35); Ex-XWO-total under 1 200 mg/l (n = 30).

tidigt för att karakterisera inflammationen. I framtiden får vi nya inflammationsmarkörer, såsom peroxidas i eosinofiler (EPO) samt lipokalin i neutrofiler (HNL), som förbättrar undersökningens cellspecificitet.

Inducerade sputumprov lämpar sig bra för bedömning av inflammationens svårhetsgrad och kan därför användas för att följa upp effekten av behandlingen. Det vore särskilt viktigt att kunna se hur inflammationen lugnar sig när behandling av astma sätts in. Patienten kan vara ganska symptomfri och lungfunktionen normal medan sputumprovet fortfarande visar stark astmatisk inflammation. Då skall läkemedelsbehandlingen inte trappas ned eller dosen minskas. Det finns även patienter som i onödan använder astmamediciner eller har onödigt stora doser. En objektiv värdering av den astmatiska inflammationen hjälper även vid handläggningen av dessa patientfall.

Tari Haahtela, Tuula Metso och Paula Ryttilä
Kliniken för hudsjukdomar och allergi
Helsingfors universitetscentrala sjukhus
PB 126
000290 HUS

Litteratur

- Haahtela T. Astman kaltainen tulehdus – uusi termi tarpeen. *Duodecim* 1996;112:558-563.
- Haahtela T, Metso T, Ryttilä P ja HYKS:n iho- ja allergiasairaalan työryhmä. Indusoitu yskös - avain astmatulehduksen havaitsemiseen ja seurantaan. *Suom Lääkäril* 1999; 1:XX
- Helenius I, Ryttilä P, Metso T, Haahtela T, Venge P, Tikkanen HO. Respiratory symptoms, bronchial responsiveness and cellular characteristics of induced sputum in elite swimmers. *Allergy* 1998;43:346-352.
- Metso T, Kilpiö K, Björkstén F, Kiviranta K, Haahtela T. Can early asthma be confirmed with laboratory tests? *Allergy* 1996;51:226-23 1.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowich R, ym. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-29.
- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, ym. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:3 08-3 17.
- Sorva P, Metso T, Turpeinen M, Juntunen-Backman K, Björkstén F, Haahtela T. Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:45-50.