

ČASOPIS:

- UDRUŽENJA PULMOLOGA SRBIJE
- SEKCIJE PNEUMOFTIZIOLOGA DLV-SLD
- SEKCIJE GRUDNIH HIRURGA DLV-SLD

Izdavač: INSTITUT ZA PLUĆNE BOLESTI VOJVODINE,
Sremska Kamenica, Srbija

Publisher: INSTITUTE FOR PULMONARY DISEASES OF VOJVODINA,
Sremska Kamenica, Serbia

OSNIVAČ I PRVI GLAVNI UREDNIK:
FOUNDER AND THE FIRST EDITOR IN CHIEF:
Akad. dr STEVAN GOLDMAN

Glavni i odgovorni urednik / Editor in Chief: Stanić Jelena (Sremska Kamenica)

Zamenik glavnog i odgovornog urednika / Deputy Editor: Pavlović Slobodan (Sremska Kamenica)

Pomoćnik glavnog i odgovornog urednika / Assistant of Editor: Zarić Bojan (Sremska Kamenica)

Uređivački kolegijum / Editorial Staff: Perin B. (Sremska Kamenica), Považan Đ. (Sremska Kamenica), Kuruc V. (Sremska Kamenica), Kopitović I. (Sremska Kamenica), Sečen N. (Sremska Kamenica), Vučković D. (Sremska Kamenica), Cvetković V. (Sremska Kamenica), Đurić D. (Sremska Kamenica), Kurucin T. (Sremska Kamenica), Stojanović M. (Sremska Kamenica)

Redakcijski odbor / Editorial Board: Zarogoulidis K. (Grčka), Stamatis, G. (Nemačka), Eberhardt W.E.E. (Nemačka), Quix E. (Belgija), Rozman A. (Slovenija), Pirker R. (Austrija), Gajić O. (USA), Treasure T. (Engleska), Samaržija M. (Hrvatska), Mehić B. (BiH), Radosavljević D. (Srbija), Dudvarski-Ilić A. (Srbija), Milenković B. (Srbija), Subotić D. (Srbija), Jovanović D. (Srbija), Rančić M. (Srbija)

Sekretar redakcije/secretary: ZITA McCONNELL-DUFF (Sremska Kamenica)

Tehnički urednik i statističar/technical editor and statistics: Potić Z. (Sremska Kamenica)

Tehnički saradnik / Technical associates: Takovski V. (Sremska Kamenica), Beljin T. (Sremska Kamenica)

Prevodilac / Translator: Cigić J. (Sremska Kamenica)

Lektor/Proof reader: Pantić D. (Novi Sad)

ADRESA UREDNIŠTVA / EDITORIAL OFFICE ADDRESS: INSTITUT ZA PLUĆNE BOLESTI VOJVODINE,
21204 Sremska Kamenica, Srbija, Tel. (021) 4805-101; Fax: (021) 527-960, www.ipb-ild.edu.rs, www.institut.rs;
ipb-pneumon@eunet.rs, ipbvojvodine@gmail.com

Kompjuterski prelom i slog / Prepress: Centar za informacione tehnologije (CIT) Instituta za plućne bolesti
Vojvodine, Sremska Kamenica

Štampa / Printed by: Štamparija Instituta za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica

Tiraž / Copy printing: 300 primeraka

Mišljenjem broj 413-00-481/98-02 Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije časopis za pulmologiju i srodne oblasti "Pneumon" je publikacija od posebnog interesa za nauku i oslobođen je poreza na promet.

SADRŽAJ/vol.50, 2013

REČ GOSTA UREDNIKA	3
<i>Biljana Zvezdin</i>	
DIJAGNOSTIKA RESPIRATORNIH POREMEĆAJA TOKOM SPAVANJA	4
DIAGNOSTICS OF SLEEP-RELATED BREATHING DISORDERS	
<i>Mirjana Jovančević Drvenica, Ivan kopitović, Dragica Miličić, Zora Pavlović-Popović</i>	
MESTO I ZNAČAJ BRONHOPROVOKATIVNIH TESTOVA U DIJAGNOSTICI ASTME	14
ROLE AND IMPORTANCE OF BRONCHIAL CHALLENGE TESTS IN ASTHMA DIAGNOSIS	
<i>Sanja Hromiš, Ivan Kopitović, Biljana Zvezdin, Olivera Maksimović, Violeta Kolarov</i>	
SAVREMENA DIJAGNOSTIKA BAKTERIJSKIH UZROČNIKA PLUĆNIH INFEKCIJA	20
CONTEMPORARY DIAGNOSTICS OF BACTERIAL PATHOGENS IN LUNG INFECTIONS	
<i>Tatjana Kurucin, Anka Vukelić, Mirjana Hadnađev, Anika Trudić, Darinka Kukavica, Svetlana Kašiković-Lečić</i>	
ULOGA MOLEKULARNIH TESTOVA U SAVREMENOJ DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE	28
THE ROLE OF MOLECULAR TESTING IN CONTEMPORARY TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC	
<i>Gordana Popović, Vesna Kuruc, Anka Vukelić</i>	
PRIMENA IGRA TESTOVA U DIJAGNOSTICI TUBERKULOZNE INFEKCIJE	32
INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS IN DIAGNOSING TB INFECTIONS	
<i>Svetlana Kašiković Lečić, Darinka Kukavica, Tatjana Kurucin, Anika Trudić, Jelka Orlović</i>	
ULOGA IZRADE ĆELIJSKIH BLOKOVA U DIJAGNOSTICI PLUĆNIH OBOLJENJA	38
ROLE OF CELL BLOCKS PREPARATION IN DIAGNOSTICS OF PULMONARY DISEASES	
<i>Milana Panjković, Živka Eri, Dragana Tegeltija</i>	
ANESTEZIJA ZA DIJAGNOSTIČKE I TERAPIJSKE PROCEDURE U PULMOLOGIJI	43
ANESTHESIA FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PROCEDURES IN PULMOLOGY	
<i>Komarčević Milena, Spasojević Ivana, Hajduković Danica, Čikara Radmila, Plzak Gordana, Petrović Stanislava, Ćirić Aleksandra</i>	
ENDOBRONHIJALNIM ULTRAZVUKOM NAVOĐENA TRANSBRONHIJALNA IGLENA ASPIRACIJA - NOVA TEHNIKA ZA PROCENU N STATUSA KOD KARCINOMA BRONHA	48
ENDOBRONCHIAL ULTRASOUND-GUIDED TRANSBRONCHIAL NEEDLE ASPIRATION - A NEW TECHNIQUE FOR EVALUATION OF N STATUS IN BRONCHOGENIC CARCINOMA	
<i>Goran Stojanović</i>	
AUTOFLUORESCENTNA VIDEOBRONHOSKOPIJA I VIDEOBRONHOSKOPIJA USKOG SNOPA SVETLOSTI U DIJAGNOSTICI KARCINOMA BRONHA	56
AUTOFLUORESCENCE VIDEOBRONCHOSCOPY AND NARROW BAND IMAGING VIDEOBRONCHOSCOPY IN LUNG CANCER DIAGNOSTICS	
<i>Bojan Zarić, Vladimir Stojšić, Tomi Kovačević, Branislav Perin</i>	
RECIST KRITERIJUMI - JUČE, DANAS, SUTRA.	67
RECIST CRITERIA - PAST, PRESENT, FUTURE.	
<i>Miloš Stojanović, Gordana Vujasinović, Dragan Dragišić, Slobodanka Pena Karan</i>	
IN MEMORIAM - ĐORĐE TABORI 1929-2013	68

reč gosta urednika

Novine o dijagnostičkim postupcima u pulmologiji
Novelties in diagnostic procedures in pulmonology
Uvodnik / Editorial



Respiratorne bolesti se nalaze na drugom mestu, nakon kardiovaskularnih, u smislu mortaliteta, incidence, prevalence i ekonomskih troškova. Predviđa se da će 2020. godine od ukupnih 68 miliona smrtnih ishoda u svetu uopšte, 12 miliona biti uzrokovano plućnim bolestima.

Pored brojnih inicijativa i programa koji su promovisani u svetu, realna činjenica je da nije dat adekvatan značaj plućnim bolestima, što je prepreka za još veći progres u dijagnostici, tretmanu i nezi plućnih bolesnika.

Tehnička dostignuća su omogućila nastanak novih dijagnostičkih metoda, ali i napredak postojećih. Upravo novinama u dijagnostičkim postupcima posvećen je ovaj broj časopisa „Pneumon“a, što je i tema ovogodišnjeg tradicionalnog sastanka pulmologa Vojvodine. Članci koji su pred Vama predstavljaju neke od najnovijih pristupa u dijagnostici plućnih bolesti, u različitim domenima - od patofiziologije disanja i poremećaja disanja tokom spavanja, pa do novih bronhoskopskih metoda, koje sve više postaju neophodnost u rutinskom radu.

U dijagnostičkom postupku i trijaži pacijenata kod najčešćeg poremećaja disanja tokom spavanja („Sleep apnea syndrome“), pored polisomnografije koriste se i različiti upitnici, što je tema rada Jovančević-Drvenice M. U savremenoj dijagnostici astme pored anamnestičkih podataka i simptoma bolesti primenjuju se i direktni i/ili indirektni bronhoprovokativni testovi, čime se pozabavila Hromiš S. Savremena laboratorijska dijagnostika primenjuje kako klasične mikrobiološke procedure, tako i savremene imunohemijske i molekularno-genetske metode. Molekularne metode imaju visoku specifičnost i senzitivnost, pomoću njih se detektuje uzročnik direktno u materijalu, dobijaju se brzi rezultati i identifikuju novi uzročnici, što je opisano u radu Kurucin T. Za identifikaciju i tipizaciju bakterija koriste se genotipske metode. Uvođenjem novih sistema za izolaciju mikobakterija (BACTEC i MGIT) prisustvo bacila tuberkuloze može znatno brže da se detektuje na osnovu njihovog metabolizma, a ne na osnovu vidljivog rasta mikobakterija. Od molekularnih tehnika najviše se primenjuju metode koje se zasnivaju na umnožavanju nukleinskih kiselina, o čemu ćete više saznati u radu Popović G. Od nedavno se u dijagnostici tuberkulozne infekcije primenjuju i IGRA testovi (T-SPOT.TB i Quantiferon) koji su zasnovani na in vitro detekciji interferona gama oslobođenog iz T ćelija u odgovoru na antigene specifične za M. Tuberculosis, o čemu je više govorila Kašiković-Lečić S. Citologija kao dijagnostička metoda zauzima važno mesto u plućnoj patologiji, posebno u dijagnostici tumora. Priprema ćelijskih blokova omogućava detaljniju analizu ćelijskog aranžmana čime se značajno povećava dijagnostička pouzdanost, senzitivnost i specifičnost citologije kao dijagnostičke metode, što je tema rad Panjković M. Savremene dijagnostičke metode u pulmologiji zahtevaju i znatno angažovanje anesteziologa, koji primenjuje različite vrste anestezije i analgosedacije kako u interventnoj bronhologiji, tako i u radiološkim i videoasistiranim hirurškim dijagnostičkim procedurama, što je obradila koleginica Komarčević M. Dijagnostička interventna pulmologija sa tehnikama u koje spadaju autofluorescentna videobronhoskopija (AFI), videobronhoskopija uskog snopa svetlosti (NBI), radijalini i linearni endobronhijalni ultrazvuk (EBUS), elektromagnetna navigaciona bronhoskopija (EMN) danas je osnova dijagnostike karcinoma bronha. Ove tehnike omogućuju brzo vizuelno razlikovanje patološkog procesa u sluznici bronha i minimalno invazivnu dijagnostiku promena u medijastinumu, što je objašnjeno u radovima Zarić B. i Stojanović G. RECIST kriterijumi imaju za cilj da „kvantifikuju“ radiološku sliku kod onkoloških bolesnika, kako bi se omogućio uvid u tok oboljenja. Služe za praćenje dinamike radiološke slike u funkciji vremena, i o tome je pisao Stojanović M.

Živimo u modernoj eri i dobu „fragmentacije znanja“, čija je, možda, najveća „žrtva“ respiratorni sistem. Ova stručna publikacija dopunjava literaturnu osnovu o veoma važnom zdravstvenom globalnom problemu - značaju adekvatnih i savremenih dijagnostičkih procedura najčešćih plućnih bolesti. Prikaz savremenih i stručnih činjenica o najčešćim dijagnostičkim postupcima u pulmologiji ima za cilj da doprinese poboljšanju znanja, bržoj i adekvatnoj dijagnostici, time i tretmanu i poboljšanju kvaliteta života naših pacijenata.

Prof. dr. Biljana Zvezdin
predsednik Sekcije pneumoftiziologa DLV-SLD

DIJAGNOSTIKA RESPIRATORNIH POREMEĆAJA TOKOM SPAVANJA

DIAGNOSTICS OF SLEEP-RELATED BREATHING DISORDERS

Jovančević Drvenica Mirjana, Kopitović Ivan, Miličić Dragana, Pavlović-Popović Zora

Korespondencija:

Mr dr Mirjana Jovančević- Drvenica

CENTAR ZA PATOFIZIOLOGIJU DISANJA

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:4-13

SAŽETAK

Sleep apnea syndrome predstavlja jednu od najvećih grupa respiratornih poremećaja koji nastaju tokom spavanja (SDB). Ona može biti centralni (Central Sleep Syndrome – CSAS), i opstruktivni sleep apnea/hipopnea sindrom (Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome – OSAHS), a izdvaja se i poseban entitet – sindrom povećanog otpora u gornjim disajnim putevima (Upper Airway Resistance Syndrome – UARS). SAS se javlja u 2-26% opšte populacije u zavisnosti od pola, starosti i indeksa telesne mase. Prisustvo SAS kod pacijenata dovodi do povećanog rizika za oboljevanje od kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih, neurokognitivnih i metaboličkih poremećaja. Simptomi koji ukazuju na postojanje SDB mogu biti dnevni i noćni. Noćni simptomi su: hrkanje, posvedočeni prestanci disanja, nemiran san, noćna dispnea - gušenje, kratko dahtanje, ezofagealni refluks, suva usta i žeđ, bruksizam i nokturija. Dnevni simptomi su: dnevna pospanost, umor, jutarnje glavobolje, personalne i psihološke promene, smanjenje libida, impotencija. Klinički pregled podrazumeva računanje BMI, merenje obima vrata, merenje arterijskog pritiska, određivanje Mallampati konfiguracije ždrela i prisustva kraniofacijalnih abnormalnosti. Ekscesivna dnevna pospanost, kao najznačajniji simptom, se objektivno može izmeriti merenjem latence sna više puta tokom jednog dana, a subjektivno proceniti na osnovu Epworthove skale pospanosti. „Zlatni standard“ za postavljanje dijagnoze SAS je polisomnografija, koja podrazumeva neinvazivno merenje vitalnih parametara tokom sna. Analizom parametara, koji se svrstavaju u 4 grupe (respiratorni, neurološki, kardiološki, pomeranje tela) koji se evaluiraju i utvrđuje se tip i stepen poremećaja. Iako je testiranje PSG referentni standard za dijagnozu SDB, dokazano je da se OSA može dijagnostikovati prenosnim sistemima za monitorisanje u definisanim uslovima. Sistemi sa manje kanala mogu dati dobre indikacije za postojanje respiratornih poremećaja tokom spavanja, ali nisu dovoljni za postavljanje dijagnoze. Savremeniji senzori i bolja analiza signala će ponuditi veću sigurnost u dijagnostici SDB, a bolja trijaža bi trebala da podrazumeva široku upotrebu sleep upitnika, naročito u primarnim zdravstvenim ustanovama.

Ključne reči: sleep apnea sindrom, polisomnografija, ekscisivna dnevna pospanost

SUMMARY

Sleep apnea syndrome (SAS) represents one of the greatest groups of Sleep disordered breathing – SDB. It includes Central Sleep Syndrome – CSAS, Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome – OSAHS, and a one specific entity – Upper Airway Resistance Syndrome – UARS. The estimated prevalence in general population for SAS is 2-26%, depending on sex, age and BMI. Patients presenting with the SAS are in greater risk to suffer from cardiovascular, cerebrovascular, neurocognitive and metabolic disorders. The symptoms indicating the presence of SDB are divided in day and night symptoms. The night symptoms include snoring, witnessed apneas, restless sleep, night breathlessness and choking sensations, gasping, esophageal reflux, thirst, dry mouth, bruxism and nocturia. The day symptoms are daytime sleepiness, fatigue, morning headaches, personal and psychological changes, decreased libido, impotention. Clinical examination involves calculation of BMI, measurement of the neck circumference and blood pressure, assessment of Mallampati

score and presence of craniofacial abnormalities. Excessive daytime sleepiness, as the most important symptom, can be objectively assessed by measuring sleep latency multiple times per day (Multiple Sleep Latency Test - MSLT, Maintenance of Wakefulness Test - MWT), and subjectively estimate with Epworth scale of sleepiness -ESS. The golden standard for establishing the diagnosis of SAS is polysomnography (PSG), which involves non-invasive measuring of vital parameters during sleep. With the analysis of parameters, which are divided in four groups (respiratory, neurological, cardiological, body movements) the type and severity level of the disorder is being established. OSA diagnosis also can be established with portable monitoring systems in defined conditions. Systems with less channels can indicate properly SDB, but are insufficient for diagnosis. Modern sensors and better signal analysis will offer higher security level in diagnostics of SDB, and thorough triage should include a wide sleep-questionnaire usage, especially in primary health care.

Key words: sleep apnea, polysomnography, excessive daytime sleepiness

Respiratorni poremećaji tokom spavanja (Sleep disordered breathing – SDB) prema Internacionalnoj klasifikaciji bolesti, obuhvataju nekoliko velikih grupa poremećaja spavanja (tabela 1), a najveća podgrupa je sleep apnea sindrom (*Sleep Apnea Syndrome – SAS*).⁽¹⁾ Ona može biti centralni sleep apnea sindrom (Central Sleep Syndrome – CSAS), opstruktivni sleep apnea/hipopneja sindrom (Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome – OSAHS), a izdvaja se i poseban entitet – sindrom povećanog otpora u gornjim disajnim putevima (Upper Airway Resistance Syndrome – UARS). OSAHS i UARS spadaju u opstruktivne poremećaje spavanja. OSAHS karakterišu rekurentne epizode kolapsa i opstrukcije gornjih disajnih puteva tokom sna, praćenih desaturacijom i mikrobuđenjima (arousals), kao i ekscitativnom dnevnom pospanošću. Ukoliko dnevna pospanost nije prisutna, onda govorimo o entitetu koji se naziva opstruktivna sleep apnea/hipopneja (OSAH). UARS se karakteriše prisustvom svih simptoma i znakova karakterističnih za OSAHS, ali odsustvom opstruktivnih doga-

đaja. CSA se karakteriše odsustvom ili smanjenjem pokreta mišića grudnog koša što uzrokuje prestanak disanja tokom sna, koje se periodično ponavlja, a posledica je nesavršenosti refleksno-metaboličke regulacije disanja iz centara u moždanom stablu.⁽²⁾

SAS se javlja u 2-26% opšte populacije u zavisnosti od pola, starosti i indeksa telesne mase. Kod muškaraca srednjih godina je prisutna u 4% slučajeva, a kod žena u 2% slučajeva. Prevalenca varira u zavisnosti od populacije, tako je u Engleskoj prisutna sa samo 0,3%, a u Izraelu i Australiji sa 20-25%.⁽³⁻⁵⁾

Prisustvo SAS kod pacijenata dovodi do povećanog rizika za oboljevanje od kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih, neurokognitivnih i metaboličkih poremećaja. (6-9) Pacijenti sa SAS imaju povećan ne samo kardiovaskularni morbiditet, koji uključuje oboljevanje od hipertenzije, aritmije, infarkta miokarda, cerebrovaskularnog infarkta, već i značajno povećan kardiovaskularni mortalitet. Pacijenti koji boluju od OSA povezani su sa razvojem insulinske re-

Tabela 1 – Respiratorni poremećaji tokom spavanja (*Sleep-related breathing disorders*)

Opis	Sinonimi
Opstruktivni sleep apnea sindrom (<i>Obstructive sleep apnoea syndrome OSAS</i>)	Hipoventilacioni sindrom kod gojaznih (<i>Obesity hypoventilation syndrome</i>) Pikvikov sindrom (<i>Pickwickian syndrome</i>)
Centralni sleep apnea sindrom (<i>Central sleep apnoea syndrome CSAS</i>)	Neopstruktivna sleep apnea (<i>Nonobstructive sleep apnoea</i>) Čejn – Štoksovo disanje (<i>Cheyne-Stokes respiration</i>)
Centralni alveolarni hipoventilacioni sindrom (<i>Central alveolar hypoventilation syndrome</i>)	Primarna alveolarna hipoventilacija (<i>Primary alveolar hypoventilation</i>) Neapneična alveolarna hipoventilacija (<i>Nonapnoeic alveolar hypoventilation</i>)
Primarno hrkanje (<i>Primary snoring</i>)	Hrkanje (<i>simple snoring</i>)
Sleep apnea dečjeg uzrasta (<i>Infant sleep apnoea</i>)	Apnea kod prevremeno rođene dece (<i>Apnoea of prematurity</i>) Apnea dečjeg uzrasta (<i>Apnoea of infancy</i>) Iznenadni životno ugrožavajući događaji (<i>Apparent life-threatening event</i>) Opstruktivni sleep apnea sindrom (<i>Obstructive sleep apnoea syndrome</i>)
Urođeni centralni hipoventilacioni sindrom (<i>Congenital central hypoventilation syndrome</i>)	Primarni alveolarni hipoventilacioni sindrom (<i>Primary alveolar hypoventilation syndrome</i>) Ondinina kletva (<i>Ondine's curse</i>)

zistencije, dijabetesom melitusom i metaboličkim sindromom. (3,10)

Kod pacijenata sa SAS je narušena arhitektonika sna, tj. odnos pojedinih faza sna nije pravilan, što je posledica učestalog buđenja nakon apnea i hipopnea, tako da pacijenti ne ulaze u dubok san tzv. sporotalasno spavanje (faza 3 i 4 spavanja, sa predominacijom delta talasa), koje obnavlja organizam. Narušena arhitektonika sna podrazumeva poremećane fiziološke cikluse spavanja, kojih tokom noći ima 4-5 i oni završavaju mikrobuđenjima koja otvaraju nov ciklus. REM (rapid eye movement - brzi pokreti očiju) faza sna se pri svakom novom ciklusu produžava.

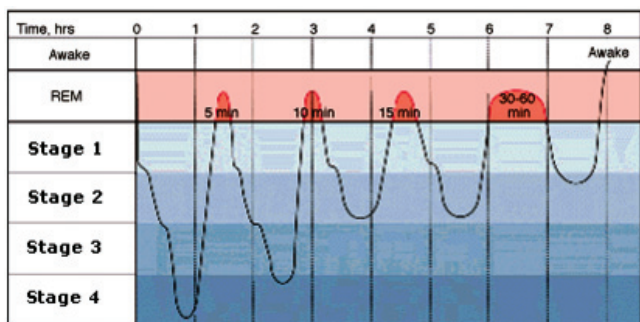
Zbog ovako narušene arhitektonike spavanja, osoba najviše boravi u fazi 1 (površnog) spavanja umesto faze 2 koja treba da je najdominantnija, a duboki (delta) san se nekada skoro ne registruje. Dakle, nonREM san je značajno poremećen, ali i REM faza je često skraćena, takođe jako fragmentovana jer je povezana sa hipotonijom mišića i sledstveno češćom pojavom apnea/hipopnea nego u toku nonREM spavanja, i ukoliko su respiratorni događaji vezani samo za tu fazu sna poremećaj se naziva sleep apnea vezana za brze pokrete očiju (REM related sleep apnea). (6)

Simptomi koji ukazuju na postojanje SDB mogu biti dnevni i noćni.

Noćni simptomi su: hrkanje, posvedočeni prestanci disanja, nemiran san, noćna dispnea - gušenje, kratko dah-tanje, ezofagealni refluks, suva usta i žeđ, bruksizam i nokturija.

Dnevni simptomi su: dnevna pospanost, umor, jutarnje glavobolje, personalne i psihološke promene, smanjenje libida, impotencija.

Hrkanje je najčešći simptom i simptom koji najviše smeta pacijentima. Ovaj simptom je posledica sušenja i vibracija mekih struktura nepca. Utvrđeno je



Slika 1 Faze spavanja: non-REM (1,2,3,4) i REM
(Dostupno na: <<http://lucid-dreaming-guide.com/images/Sleep-Cycle.gif>, Pristupljeno:02/09/2013)

da 95% pacijenata koji imaju OSA hrču, a da 46% su pružnika koji hrču spava odvojeno, dok 30% trudnica hrče. Prevalenca kod muškaraca je 5-86%, a kod žena 2-57%. Hrkanje je karakteristično za inspirijum i može se javiti u svim stadijumima sna, ali najčešće se javlja u 2, 3 i 4 stadijumu sna. Spada u veoma subjektivne



Slika 2. Mallampati konfiguracija ždrela, stadijumi.

(Brodsky J and Margaron M. Weighing in on surgical safety.[Aug 2010.]
Dostupno na: <<http://webmm.ahrq.gov/case.aspx?caseID=221> >
Pristupljeno: 03/09/2013)

parametre, te su studije pokazale da 15 % pacijenata koji su rekli da ne hrču, hrkali su više od 50% noći, a da 15% onih koji tvrde da hrču nije uopšte hrkalo tokom snimanja. (2,3)

Klinički patognomoničan je podatak o prestanku disanja tokom sna, posvedočen od strane partnera i prisutan je u 75% slučajeva. Javlja se i u 6% zdrave populacije.

Pacijenti sa SAS su često nemirni, pa čak i mogu biti nasilni tokom sna.

Nokturnalna dispnea nastaje kao posledica respiratornih pokreta grudnog koša pri apnei i veće negativizacije pritiska u grudnom košu. Ovaj tip dispnee karakteriše brz oporavak nakon buđenja, za razliku od dispnee drugog porekla (na pr. srčana insuficijencija) koja se znatno sporije povlači. (2,3)

Može se javiti ezofagealni refluks kao posledica povišenja intraabdominalnog pritiska i veće negativizacije intratorakalnog pritiska, što dovodi do nastanka gorušice. Nokturija nastaje kao posledica povećanog lučenja natriuričnog peptida i, takođe, povećanja intraabdominalnog pritiska. (2,3)

Dnevna pospanost je ubikvitaran fenomen karakterističan za veliki broj somatskih, psihijatrijskih i primarnih bolesti spavanja, ali i kao normalno fiziološko stanje. Ona

može biti veoma suptilna, kada pacijenti ne ustaju ujutro osveženi, ali isto tako i veoma teška (EDS – *Excessive Daytime Sleepiness*), kada pacijenti zaspivaju dok voze. Posledice dnevne pospanosti su skraćanje vremena zaspivanja (latenca sna), smanjenje pažnje, kognitivnih funkcija, koncentracije, reaktivnog vremena, što utiče na sposobnost upravljanja motornim vozilima i na smanjenje radne sposobnosti. (2,3)

Jutarnje glavobolje su karakterističan simptom kod polovine pacijenata sa SAS, one su generalizovane i mogu da traju 1-2 sata.

Kod pacijenata sa SAS nisu prisutni svi znaci, već pojedini od navedenih.

Za UARS je karakteristično manje dnevne pospanosti, a više je izražen umor, slabost, somatski simptomi, posturalna hipotenzija, češće je udružen sa hroničnom insomnijom i parasomnijom, ali se pacijenti više žale na umor nego na nesanicu. (2,3,4)

Rizikofaktori za nastanak SDB:

- Gojaznost kao rizikofaktor se evaluira kroz indeks telesne mase (BMI - *body mass index*). Ukoliko je BMI veći od 25 kg/m² postoji velika verovatnoća da pacijent ima i SAS, pri čemu je senzitivnost 93%, a specifičnost 74%.
- Godine – 65% pacijenata, koji imaju SAS, su stariji od 65 godina.
- Pol – češće obolevaju muškarci, što se može povezati i sa androidnim tipom gojaznosti (nakupljanje masnoće u vratu i abdomenu), iako broj obolelih žena raste nakon menopauze. Odnos obolelih muškaraca i žena je (2-3):1.
- Genetika – pozitivna porodična anamneza je značajna. Rođaci prvog stepena imaju 21-84% šanse da dobiju SAS.
- Kraniofacijalne osobine i abnormalnosti – retrognacija, mikrognacija, makroglosija, tonzilarna hipertrofija tonzila itd.
- Alkohol i sedativi – smanjuju mišićni tonus, naročito ako se koriste u večernjim časovima utiču na razvoj većeg broja apnea u snu.
- Respiratorne alergije i nazalna kongestija mogu prouzrokovati hrkanje i SDB.
- Adenotonzilarna hipertrofija – naročito kod dece i mladih uzrokuje prestanke disanja tokom sna. (2,3)

Uzimanjem adekvatne istorije bolesti i kliničkim pregledom se može utvrditi prisustvo OSA sa zadovoljavajućom senzitivnošću (80%), ali sa niskom specifičnošću (50%). (3)

Klinički pregled podrazumeva nekoliko osnovnih stavki:

- merenje telesne težine, telesne visine i računanje BMI,

- merenje obima vrata (OV),
- merenje arterijskog pritiska (TA),
- određivanje Mallampati konfiguracije ždrela; Ovaj skor je godinama korišćen radi identifikacije pacijenata koji su rizični za trahealnu intubaciju. Određuje se na osnovu slike koju vidimo (slika 1.) kada pacijent otvori usta i ispruži jezik izvan usne duplje ili fonira,
- utvrđivanje prisustva kraniofacijalnih abnormalnosti.

Upitnici i testovi

EDS, kao najznačajniji simptom, se objektivno može izmeriti merenjem latence sna više puta tokom jednog dana (*Multiple Sleep Latency Test* - MSLT, *Maintenance Wakefulness Test* - MWT i OSLEOV test), a subjektivno proceniti na osnovu Epfortove skale pospanosti (*Epworth sleepiness scale* - ESS) ili Stanfordove skale pospanosti (Stanford Sleepiness Scale - SSS). (2-4)

ESS je najrasprostranjeniji upitnik za subjektivno merenje dnevne pospanosti kod pacijenata koji boluju od poremećaja spavanja. Upitnik se sastoji od 8 pitanja kojima se određuje stepen pospanosti u određenim životnim situacijama, gde se od pacijenta traži da stepenuje mogućnost zaspivanja u svakoj opisanoj situaciji bodovima od 0 do 3 (slika 2.). Raspon bodova je od 0-24, pri čemu je granica (*cutt of*) iznad 10 i ukazuje na postojanje ekscesivne dnevne pospanosti. (2)

ESS je originalno kreirana za englesko govorno područje, ali je prevedena na mnoge jezike sveta i dokazana je njena pouzdanost i validnost, što je potrebno sprovesti zbog mogućih kulturoloških, socijalnih i lingvističkih faktora. (11-20) Validacija i prevođenje ESS na srpski jezik je urađena 2010. godine na Institutu za plućne bolesti Vojvodine. (21)

Rezultate koji se dobijaju ESS je potrebno kombinovati sa objektivnim parametrima i metodama pri evaluaciji pacijenata sa SAS. U te svrhe je često korišćen Berlinski upitnik, a u novije vreme sve češće se koristi STOP BANG upitnik.

„STOP BANG“ upitnik (slika 3.), koji je senzitivniji u dijagnostici SAS. Upitnik se stoji od 8 jednostavnih pitanja i počinje sa akronimom „STOP BANG“ (*Snoring* – hrkanje; *Tired* – umor; *Observed* – posmatrano, odnosi se na prestanak disanja; *Pressure blood* – arterijski pritisak; BMI; *Age* – godine, *Neck circumference* – obim vrata; *Gender* – pol). Bodovanje je zasnovano na da/ne odgovorima, pri čemu se „da“ obeležava sa 1, a „ne“ sa 0. Raspon bodova je 0-8, a granična vrednost je ≥3. Test ima visoku senzitivnost u detekciji umerenog (93%) i teškog (100%) SAS, dok mu je specifičnost niska zbog velikog broja lažno pozitivnih rezultata. (22-24)

MSLT se sastoji u merenju latence kratkotrajnog sna (oko 20 minuta) 4-5 puta u toku dana, sa razmakom od 2 sata. Izračunava se srednja vrednost latence sna, na osnovu koje se procenjuje dnevna pospanost. Uobičajeno la-

tenca sna je veća od 10-15 minuta, dok je kod pacijenata sa SAS manja od 10 minuta. Test se izvodi obično dan nakon PSG snimanja i najčešće se koristi za utvrđivanje postojanja narkolepsije. (2-4,25)

MWT se koristi za testiranje održavanja budnosti, tj. da se utvrdi koliko dugo je pacijent u stanju da se održi budnim. Pacijent treba da bude u zatamnjenoj sobi u poluležećem položaju i treba da je instruisan da što duže ostane budan. Testira se koliko je potrebno vremena da pacijent 5 (ili 4) puta zaspi sa razmakom od 2 sata i beleži se latencija sna. Ukoliko pacijent nakon 20 min (ili 40 min) ne zaspi, test se završava. Na kraju testiranja se izračuna srednja vrednost latencije sna. Prethodno PSG testiranje nije neophodno. (2-4,25)

Polisomnografija:

Monitorisanje pacijenata kod kojih se sumnja na postojanje SBD moguće je na više načina prikazanih u Tabeli 2. (26)

„Zlatni standard“ za postavljanje dijagnoze SAS je polisomnografija (PSG), koja podrazumeva neinvazivno merenje vitalnih parametara tokom sna. Naziv vodi poreklo od grčkih i latinskih reči: πολύς „polis“ znači mnogo, puno i upućuje na mnogo odnosa koji se koriste pri snimanju, „somnus“ što na latinskom znači spavati i grčki γράφειν - pisati. Nalaz koji se dobija PSG studijom naziva se polisomnogram (PSG).

Može biti jednostavna, bez praćenja moždane aktivno-

EPFORTOVA SKALA POSPANOSTI

Ime i prezime: _____ Datum rođenja: _____

Koristite sledeću skalu da najpodesnije ocenite Vaše ponašanje u izvesnim dnevnim situacijama. Ponovite testiranje ako niste sigurni u preciznost odgovora.

0 = nikad ne zadremam niti zaspim

1 = mala mogućnost da zadremam ili zaspim

2 = umerena mogućnost da zadremam ili zaspim

3 = velika mogućnost da zadremam ili zaspim

Situacija	mogućnost da se zadrema ili zaspi
-----------	--------------------------------------

sedenje i čitanje	_____
-------------------	-------

gledanje televizora	_____
---------------------	-------

pasivno sedenje na javnom mestu (predavnja ili sastanci)	_____
--	-------

prevoženje (putnik) u vozilu duže od sat vremena	_____
--	-------

opušiti se poslepodne na krevet	_____
---------------------------------	-------

opušteno sedeti i pričati sa nekim	_____
------------------------------------	-------

sedeti mirno nakon ručka (bez alkohola)	_____
---	-------

čekati u saobraćaju više minuta kao vozač	_____
---	-------

Totalni skor (zbir) _____

Datum analize: _____ Potpis pacijenta: _____

Slika 3. Epfortove skale pospanosti (Epworth sleepiness scale - ESS) (21)

sti (EEG sa EOG) i tada se po nomenklaturi naziva poligrafija (PG). Poligrafski parametri su bazično oni koji tokom spavanja prate disanje (protok vazduha – flow) što se sprovodi preko oronazalne kanile i/ili termistorske sonde (ne preporučuje za detekciju hipoventilacija), pokrete (effort) zida grudnog koša (primarno) i abdomena (sekundarno) pomoću elastičnih pojaseva sa senzorima, kao i pulsna oksimetrija za merenje saturacije i frekvencije pulsa. Za praćenje intenziteta hrkanja se koristi mikrofoni. Neophodno je kao bazični minimum imati trijas protok vazduha-pokreti disanja-saturacija (flow-effort-satO₂). (3)

EEG se prate i određuju faze sna, dok je za REM fazu potreban i EOG uz EMG, najčešće submentalne regije (tonus mišića, važan za REM fazu). Može se EMG raditi i na donjim ekstremitetima za dijagnostikovanje sindroma nemirnih nogu (RLS - Restless Legs Syndrome) ili kao bolest periodinih pokreta ekstremiteta (PLMD - Periodic Limb Movement Disorder). (2,3)

AASM (*American Academy of Sleep Medicine* – Američka akademija za medicinu sna) vodič definiše vrstu senzora koji se koriste u detekciji respiratornih događaja:

- za detekciju apnee oronazalna termistorska sonda
- za detekciju hipopnee nazalni senzor na bazi pritiska
- za respiratorne pokrete ezofagealna manometrija ili induktivna pletizmografija
- za saturaciju pulsni oksimetar sa brzim odgovorom (<3s).

Nakon postavljanja elektroda, potrebno je proveriti njihove otpore, koji moraju takođe da zadovoljavaju kriterijume AASM.

Indikacije za PSG prema AASM iz 2005.godine su:

- postavljanje dijagnoze SBD,
- titracija pozitivnim vazдушnim pritiskom (PAP) kod pacijenata sa SBD,

STOP BANG upitnik

Ime i prezime: _____ Datum rođenja: _____

1. Hrkanje:

Da li glasno hrčete (glasnije nego što pričate ili dovoljno glasno da vas mogu čuti iza zatvorenih vrata)?

DA

NE

2. Umor:

Osećate li se često umorno, zamarate li se ili ste pospani tokom dana?

DA

NE

3. Prestanak disanja:

Da li je neko primetio da ste prestali disati tokom spavanja?

DA

NE

4. Arterijski pritisak

Da li imate ili se lečite od povišenog pritiska ?

DA

NE

5. BMI (BMI=body mass index):

Da li je BMI veći od 35 kg/m²?

DA

NE

6. Starost:

Da li imate 50 godina ili više ?

DA

NE

7. Obim vrata

Da li je obim vrata veći od 40cm?

DA

NE

8. Pol

Da li ste muškog pola?

DA

NE

ZBIR (broj pozitivnih odgovora) :

Datum analize: _____

Potpis pacijenta: _____

Slika 4. STOP BANG upitnik (*Prevedeno i adaptirano*) (22)

Tabela 2. Parametri koji se prate pri različitim tipovima monitorisanja SBD.

Tip	Sistem monitorisanja	Parametri
1	Standardna PSG u laboratorijskim uslovima	Min 7 kanala: EEG, EOG, EMG, ECG, protok vazduha, respiratorni pokreti i saturacija
2	Sveobuhvatni prenosni sistem	Min 7 kanala: EEG, EOG, EMG, ECG, protok vazduha, respiratorni pokreti i saturacija
3	Modifikovani prenosni sistem	Min 4 kanala: protok vazduha, respiratorni pokreti, srčana frekvencija i saturacija
4	Kontinuirani jednokanalni ili dvokanalni sistem	1 ili 2 kanala: saturacija i/ili protok vazduha

EEG-elektroencefalogram, EOG-elektrookulogram, EMG-elektromiogram, ECG-elektrokardiogram

- preoperativna evaluacija kod pacijenata koji su planirani za hirurgiju gornjih disajnih puteva zbog hrkanja ili OSA,
- procena rezultata lečenja nakon terapije umerene i teške OSA oralnim aplikatorima ili hirurgije,
- praćenje odgovora na aplikovanu terapiju OSA: kod signifikantne promene telesne težine i ponovne pojave simptoma,
- pri evaluaciji pacijenata sa značajnim komorbiditetima kao što su kongestivna srčana insuficijencija, srčana sistolna i dijastolna insuficijencija sa noćnim simptomima, neuromuskularne bolesti,
- dijagnostika i evaluacija narkolepsije,
- dijagnostika i evaluacija poremećaja periodičnih pokreta nogu tokom sna (*Periodic limb movement disorder* - PLMD).

u potpunosti i prisutan je pad SaO₂ veći od 3%. (Slika 5.)

3. mešovita apnea – obično počinje kao CA, a nastavlja se sa OA. Predstavlja smanjenje termistorskog protoka više od 90 %, koje traje više od 10 s. Respiratorni pokreti su odsutni u potpunosti u početku apnee, a potom se postepeno povećavaju, a potom paradoksalno prekidaju apneju. Prisutan je pad SaO₂ veći od 3%.

OSNOVNI PARAMETRI I INTERPRETACIJA (prema AASM preporukama)

APNEA – prekid disanja tokom spavanja, koje traje najmanje 10 s. Postoje tri tipa apnea:

1. opstruktivna apnea – nastaje kao posledica parcijalne ili totalne okluzije gornjih disajnih puteva. Predstavlja smanjenja amplitude oronazalne termistorske sonde više od 90 %, koje traje više od 10 s. Često je povezana sa povećanjem respiratornih pokreta, najčešće paradoksalnih, a isto tako je često povezana sa desaturacijom (Slika 5.)
2. centralna apnea – je posledica prekida centralnog nadražaja na respiratorne mišiće. Predstavlja smanjenje termistorskog protoka više od 90 %, koje traje više od 10 s. Respiratorni pokreti su odsutni



Slika 5. Osnovni polisomnografski odvodi
(Test to Diagnose Sleep Apnea: Polysomnography <<http://www.squidoo.com/treating-sleep-apnea>>pristupljeno: 01/09/2013)

HIPOPNEA – smanjenje protoka vazduha za više od 30% udruženo sa desaturacijom i klasifikuje se najčešće samo kao opstruktivni događaj.

Prema AASM preporukama (*Medicare* definicija hipopneje) je:

- smanjenje amplitude nazalnog pritiska više od 30% u trajanju od najmanje 2 udisaja
- pad SaO₂ od najmanje 3% u odnosu na bazalnu pre nastanka respiratornog događaja ili prisutno mikrobuđenje
- ukoliko je prisutno: hrkanje, zaravnanje nazalnog inspiratornog pritiska ili pojava paradoksalnih torako-abdominalnih pokreta, koji nisu bili prisutni pre opstruktivnog događaja.
- ukoliko nijedan od navedenih nalaza nije prisutan događaj se može interpretirati kao centralna hipopnea

AASM *alternativna* definicija

- smanjenje amplitude pritiska više od 50 % u odnosu na bazalnu vrednost
- pad SaO₂ veći od 3% ili mikrobuđenja

Apnea/hipopnea indeks (AHI) – broj prekida disanja i/ili smanjenja ventilacije za preko 50%, dužih od 10 sekundi na jedan sat spavanja.

DESATURACIJA – smanjenje SaO₂ za 3% ili 4% u odnosu na bazalne vrednosti. ODI – indeks desaturacije predstavlja broj desaturacija na jedan sat spavanja.

AROUSAL – mikrobuđenje koje traje od 3-15s nakon, najmanje prethodnih 10 s stabilnog sna, kojih pacijent najčešće nije svestan. Mikrobuđenje je udruženo sa apneama, hipopneama i respiratornim događajima i utiče na fragmentaciju sna. Da bi se mikrobuđenje u REM fazi sna kvantifikaovalo kao arousal potrebno je i da postoji EMG aktivnost najmanje 1s.

Postoji tri vrste arousal-a (26):

1. Mikrobuđenje vezano za respiratorne događaje (RERA - *respiratory effort-related arousal*) je sekvenca opstruktivnog respiratornog događaja koja dovodi do mikrobuđenja, ali ne zadovoljava kriterijume za apneju i hipopneju i traje najmanje 10s, a javlja se unutar 5s od opstruktivnog respiratornog događaja. Meri se brojem arousala na jedan sat spavanja vezanih za opstruktivne događaje.
2. Mikrobuđenje vezano za pokrete nogu – kada postoji preklapanje ova dva događaja (pokretanje nogu i mikrobuđenje) ili je prošlo <0.5s između događaja, bez obzira koji se događaj prvi desio.
3. Spontana mikrobuđenja – kada ni jedan od gore navedenih kriterijuma nije prisutan.

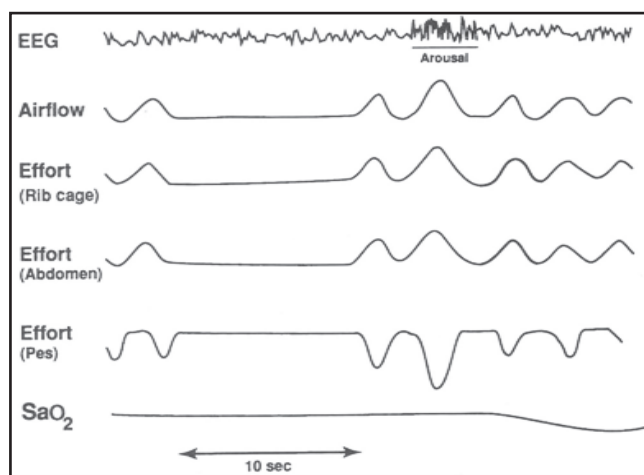
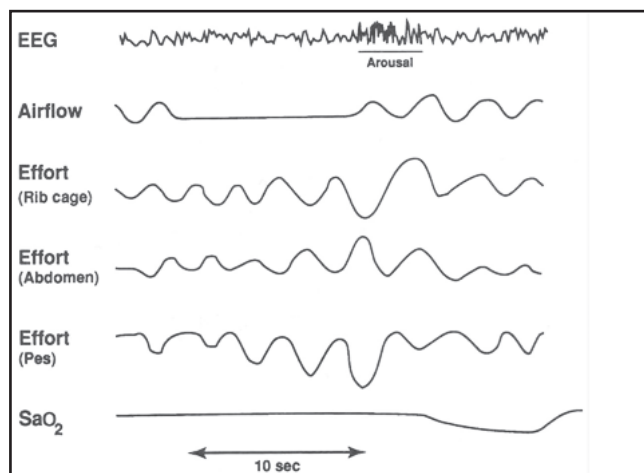
PERIODIČNI POKRETI EKSTREMITETA tokom sna (PLMS – *Periodic Limb Movements of Sleep*) – periodični pokreti ekstremiteta koji mogu da variraju od malih pokreta u zglobovima i nogama, do nekontrolisanog pokretanja sva četiri

ekstremiteta. Ovi pokreti, koji su češće u nogama nego rukama traju od 0,5 do 5s, javljaju se u 1. i 2. fazi sna, sa periodičnošću svakih 5 do 90 sekundi. Češće javljaju kod starije populacije i u sklopu sindroma nemirnih nogu – RLS ili kao PLMD. Dijagnostikuje se kada su pokreti češći od 15/sat kod odraslih (PLMS index). (27)

INDEKS RESPIRATORNIH DOGAĐAJA (RDI) je broj apnea, hipopneja i RERA na jedan sat spavanja.

AWAKNINGS – buđenja koja traju duže od 15 s.

Standardizovane kriterijumi za određivanje *faza sna* su prvi put objavili Rechtschaffen i Kales 1968. godine, (31) potom je AASM objavila reviziju 2007. godine. Prema *novoj reviziji* spojene su 3. i 4. faza sna u N3 stadijum



Slika 6. Gore – opstruktivna apnea sa sledstvenom desaturacijom i arousalom u EEG; dole – centralna apnea, takođe praćena desaturacijom i arousalom. (21)

sporotalasnog spavanja, a prethodni stadijumi 1 i 2 su preimenovani u N1 i N2.

Snimanje parametara traje najmanje 6 sati, kako bi se izbegla varijabilnost vezana za stadijume sna i poziciju tela tokom sna.

Dijagnostički kriterijumi za OSAS su postojanje jednog od kriterijuma A ili B i obavezno kriterijum C: (4,26)

A. EDS

B. prisutna 2 ili više kriterijuma od sledećih: noćna dis-

pnea (dahtanje, gušenje), česta buđenja, san koji ne osvežava, umor preko dana, oslabljena koncentracija,

C. RDI ≥ 5 .

Analizom parametara, koji se svrstavaju u 4 grupe (respiratorni, CNS, kardiološki, pomeranje tela) i ponaosob evaluiraju, utvrđuju se tip poremećaja i stepen težine poremećaja.

Na osnovu AHI indeksa SA može biti blaga: (5-15 AHI), umerena: (15-30 AHI) i teška (>30 AHI).

Monitorisanje SDB može se izvoditi i u kućnim uslovima (*portable monitoring* - PM). Prednost ovog testiranja je jednostavnost i praktičnost u izvođenju testa, niska cena, bolji kvalitet sna pacijenta u realnim uslovima. Iako je testiranje PSG referentni standard za dijagnozu poremećaja disanja tokom sna dokazano je da se OSA može dijagnostikovati prenosnim sistemima za monitorisanje u definisanim uslovima. Snimak mora da sadrži minimum 4 kanala (tabela 2.) Treba napomenuti da je ovim sistemom nemoguće razlikovati centralne i opstruktivne događaje. Prenosni monitoring je pouzdan ako se obavlja pod nadzorom obučenog osoblja i kod pacijenata kod kojih postoji velika verovatnoća prisustva SDB-a. Mana PM je zapis sa manje parametara i nižom rezolucijom signala kao i neprisustvo medicinskog osoblja za slučaj uklanjanja tehničkih problema merenja. (6) Pored toga pacijenti ne bi trebalo da pate od poremećaja spavanja i drugih komorbiditeta (srčana insuficijencija, moždani udar, dijabetes, opstruktivne ili restriktivne plućna bolest ili teška srčana aritmija). (28,29) Metaanaliza koju je objavio Ross et al. (2000. godine) pokazuje prisustvo 17% lažno negativnih rezultata, a lažno pozitivnih rezultata do 31%.

Sistemi sa manje kanala mogu dati dobre indikacije za SDB-a, ali nisu dovoljni za postavljanje dijagnoze. (4,28)

ZAKLJUČAK

SBD je velika grupa oboljenja koja ima ne samo ozbiljne medicinske konsekvence, već utiče na kvalitet života pacijenata, ali isto tako predstavlja značajno ekonomsko opterećenje. Ovo oboljenje je i dalje ostaje neprepoznato i nedovoljno dijagnostikovano. Kako je polisomnografija skupa i veoma sofisticirana metoda važno je sprovesti dobru trijažu pacijenata sa sumnjom na postojanje SAS. Savremeniji senzori i bolja analiza signala će ponuditi veću sigurnost u dijagnostici SDB, a bolja trijaža bi trebala da podrazumeva široku upotrebu sleep upitnika, naročito u primarnim zdravstvenim ustanovama.

Literatura

- Krieger J, McNicholas W, Levy P. et al. Public health and medicolegal implications of sleep apnoea. *Eur Respir J.* 2002;20:1594–609.
- Kryger MH, Roth T, Dement WC. eds. *Principles and Practice of Sleep Medicine.* 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders;2005:1043-1052.
- Tkacova R, Dorkova Z. Clinical presentations of OSA in adults. *Eur Respir Mon.* 2010;50:86-103.
- ASTA/ASA Commentary on AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events [Internet]. 2010; p.1–38. Available from: <http://www.sleep.org.au/documents/item/217> Accessed 01/09/2013.
- Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of the American Academy of Sleep Medicine Task Force; *Sleep.* 1999;22:667-89.
- Kopitović I. Respiratorni poremećaji tokom spavanja. Monografija. Medicinski fakultet, Novi Sad. 2011.
- Lavie P. Mortality in sleep apnoea syndrome: A review of the evidence. *Eur Respir Rev.* 2007;16:106,203-210.
- Harsch I. Metabolic disturbances in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir Rev.* 2007;16:106,196-202.
- Javaheri S. Treatment of obstructive and central sleep apnoea in heart failure: practical options. *Eur Respir Rev.* 2007;16:106,183-8.
- Jennum P, Riha RL. Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing. *Eur Respir J.* 2009;33:907–914.
- Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep.* 1991;14:540–5.
- Bloch KE, Schoch OD, Zhang JN, Russi EW. German version of the Epworth Sleepiness Scale. *Respiration.* 1999;66(5):440–7.
- Chen NH, Johns MW, Li HY, Chu CC, Liang SC, Shu YH. et al. Validation of a Chinese version of the Epworth sleepiness scale. *Qual Life Res.* 2002;11(8):817–21.
- Vignatelli L, Plazzi G, Barbato A, Ferini-Strambi L, Manni R, Pompei F, et al. Italian version of the Epworth sleepiness scale: external validity. *Neurol Sci.* 2003;23(6):295–300.
- Tsara V, Serasli E, Amfilochiou A, Constantinidis T, Christaki P. Greek version of the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep Breath.* 2004;8(2):91–5.
- Izci B, Ardic, S, Firat H, Sahin A, Altinors M, Karacan I. Reliability and validity studies of the Turkish version of the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep Breath.* 2008;12(2):161-8.
- Beiske KK, Kjelsberg FN, Ruud EA, Stavem K. Reliability and validity of a Norwegian version of the Epworth sleepiness scale. *Sleep Breath.* 2009;13:65-72.
- Takegami M, Suzukamo Y, Wakita T, Noguchi H, Chin, K., Kadotani, H. et al. Development of a Ja-

- panese version of the Epworth Sleepiness Scale (JESS) based on item response theory. *Sleep Med.* 2009;10:556-65.
19. Gander PH, Marshall NS, Harris R, Reid P. The Epworth Sleepiness Scale: influence of age, ethnicity, and socioeconomic deprivation. Epworth Sleepiness scores of adults in New Zealand. *Sleep.* 2005;28:249-53.
 20. Sanford SD, Lichstein KL, Durrence, HH, Riedel BW, Taylor DJ, Bush AJ. The influence of age, gender, ethnicity, and insomnia on Epworth sleepiness scores: a normative US population. *Sleep Med.* 2006;7:319-26.
 21. Kopitovic I, Trajanovic N, Prodic S, Drvenica MJ, Ilic M, Kuruc V, Kojicic M. The Serbian version of the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep Breath.* 2011;15(4):775-80.
 22. Chung F. STOP Questionnaire. A Tool to Screen Patients for Obstructive Sleep Apnea. *Anesthesiology* 2008;108:812-21.
 23. Chung F, Subramanyan R, Liao P, Sasaki E, Chapiro C, Sun Y. High STOP – Bang score indicates a high probability of obstructive sleep apnoea. *Br J Anaesth.* 2012;108(5):768- 75.
 24. Farny R, Walker B, Farny R, Snow G, Walker J. The STOP – Bang Equivalent Model and Prediction of Severity of Obstructive Sleep Apnea: Relation to Polysomnographic Measurements of the Apnea/ Hypopnea Index. *J Clin Sleep Med.* 2011;7(5):459-65.
 25. Iranco A. Excessive daytime sleepiness in OSA. *Eur Respir Mon.* 2010;50:17-30.
 26. Soose RJ, Yetkin O, Strollo PJ. Laboratory evaluation of OSA. *Eur Respir Mon.* 2010;50:121-35.
 27. Thorpy MJ. Restless legs syndrome and periodic limb movements. ACCP sleep medicine board review: course syllabus. 2007;223-31.
 28. Penzel T, Blau A, Schöbel C, Fietze I. et al. Ambulatory diagnosis of OSA and new technologies. *Eur Respir Mon.* 2010;50:136-49.
 29. Kuna ST, Badr S, Kimoff JR, Kushida C, Lee-Chiong T. et al. An official ATS/AASM /ACCP/ERS workshop report: research priorities in ambulatory management of adults with obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8:1-16.
 30. Ross SD, Sheinhardt IA, Harrison KJ. et al. Systematic review and meta-analysis of the literature regarding the diagnosis of sleep apnea. *Sleep.* 2000;23:519–32.
 31. Rechtschaffen A, Kales A, editors. Los Angeles: Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California; 1968. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system of sleep stages in human subjects.

MESTO I ZNAČAJ BRONHOPROVOKATIVNIH TESTOVA U DIJAGNOSTICI ASTME

ROLE AND IMPORTANCE OF BRONCHIAL CHALLENGE TESTS IN ASTHMA DIAGNOSIS

Hromiš Sanja, Kopitović Ivan, Zvezdin Biljana, Maksimović Olivera, Kolarov Violeta

Korespondencija:

Mr dr Sanja Hromiš

KLINIKA ZA OPŠTU PULMOLOGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:14-19

SAŽETAK

Astma je hronična inflamatorna bolest disajnih puteva koja se karakteriše promenljivim simptomima, reverzibilnom opstrukcijom i bronhijalnom hiperreaktivnošću (BHR). BHR se dokazuje bronhoprovokativnim testovima. Zavisnosti od načina delovanja agonista, testovi se mogu podeliti na direktne i indirektne. Histamin i metaholin spadaju u grupu direktnih agonista koji deluju na glatke mišiće bronha dovodeći do bronhoopstrukcije. Ovi testovi se najčešće koriste se u dijagnostici astme zbog visoke negativne prediktivne vrednosti. Manitol, hipertoni slani rastvor i fizički napor predstavljaju indirektne agoniste, koji dovode do nealergijske aktivacije inflamacijskih ćelija i oslobađanja medijatora (prostaglandina, leukotrijena, histamina). Indirektni testovi imaju visoku specifičnost jer odražavaju stepen inflamacije i dobro koreliraju sa kliničkim karakteristikama astme. Kod pojedinih pacijenata neophodno je načiniti oba testa kako bi se obezbedila tačnost u potvrdi ili isključivanju dijagnoze astme.

Ključne reči: direktni bronhoprovokacioni testovi, indirektni bronhoprovokacioni testovi, bronhijalna hiperreaktivnost, astma, dijagnoza

SUMMARY

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by variable symptoms, reversible obstruction and airway hyperresponsiveness (AHR). AHR is proving by challenging the airways. The dependence of the mechanisms of agonists' action, tests can be divided in direct and indirect. Histamine and metacholine are direct agonists of the bronchial smooth muscle, leading to the airway obstruction. This tests are vary useful in asthma diagnosis because of great negative predictive values. Powder manitol, hypertonic saline and exercise are indirect agonists that leading to the nonallergic activation of inflammatory cells and realizing of the mediators (prostaglandins, leukotrienes, histamine). Indirect challenge tests have a great specifity because they maintain the level of inflammation and correlate well with the clinical characteristics of asthma. With some patients it is necessary to use both tests in order to get accurate results and be able to exclude or verify the diagnosis of asthma.

Key words: direct bronchial provocation tests, indirect bronchial provocation tests, airway hyperresponsiveness, asthma, diagnosis

Uvod

Bronhoprovokativni testovi (BPT) čine grupu dinamičkih testova kojima se dokazuje povećana reaktivnost disajnih puteva na dejstvo različitih stimulansa tzv. bronhijalna hiperreaktivnost (BHR). Testove je u kliničku praksu uveo Robert Tiffeneau sredinom 40-tih godina prošlog veka (1). Tiffeneau je pretpostavio da evaluacija promena volumena izdahnutog vazduha u prvoj sekundi ekspirijuma (FEV1) nakon primene bronhodilatatora ili tokom nespecifične stimulacije, može biti od koristi u proceni pacijenata sa bolestima disajnih puteva. Danas postoje mnogobrojni standardizovani BPT koji se koriste u dijagnostici i diferencijalnoj dijagnostici astme, određivanju težine bolesti i odgovora na tretman kao i u epidemiološkim i kliničkim studijama. Iako postoje različite podele, od 1987. godine se najčešće koristi podela preporučena od strane Pauwel, prema mehanizmu dejstva agonista na glatke mišićne bronha na; direktne i indirektne BPT (2). Direktni agonisti dovode do direktne stimulacije mišićnih receptora i bronhospazma, dok indirektni deluju preko oslobođenih medijatora iz inflamatornih i rezidentnih ćelija sluznice, ali i preko neurotransmitera oslobođenih iz senzornih nerava.

Izvođenje BPT zahteva poznavanje i poštovanje internacionalnih smernica kao i dobro obučeno i utrenirano osoblje. Testovi mogu pružiti dragocene i zanimljive podatke o samoj bolesti, ali je pre njihovog izvođenja neophodno proceniti odnos koristi i rizika. U relativne kontraindikacije spadaju reverzibilna opstrukcija disajnih puteva, nemotivisanost pacijenta, trudnoća i laktacija. Testovi su apsolutno kontraindikovani kod teških opstruktivnih poremećaja ventilacije ($FEV1 \leq 50\%$ ili $\leq 1,0L$), infarkta miokarda u poslednja 3 meseca, nekontrolisane hipertenzije i poznate aneurizme aorte. Osim toga, neophodno je razmotriti sve faktore koji mogu privremeno smanjiti ili povećati BHR (Tabela 1) i time uticati na rezultate testiranja (3).

Odabir BPT zavisi od indikacije, a za pravilnu interpretaciju nalaza je neophodno dobro poznavanje patofizioloških odnosa i mehanizama dejstva. Cilj ovog rada je prikaz najvažnijih karakteristika pojedinih BPT i njihovog značaja u dijagnostici i lečenju astme.

Direktni bronhoprovokativni testovi

Direktni BPT su najčešće korišćeni testovi u svakodnevnoj praksi za dijagnozu astme i u kliničkim studijama za eva-

Tabela 1. Faktori koji utiču na bronhijalnu hiperreaktivnost (4)

FAKTORI KOJI MOGU SMANJITI BHR	Minimalni interval od poslednjeg korišćenja
Lekovi	
Bronhodilatatori kratkog dejstva (slabutamol)	8 h
Bronhodilatatori srednje-dugog dejstva (ipratropijum)	24 h
Bronhodilatatori dugog dejstva (salmeterol, formoterol, tiotropijum)	48 h (za tiotropijum 1 ned)
Oralni bronhodilatatori	
Teofilin intermitentnog dejstva	24 h
Teofilin dugog dejstva	48 h
Tablete β_2 agonista	24 h
Antihistaminici (hydroxazine, cetirizine)	3 dana
Modifikatori leukotriena	24 h
Hrana	
Kafa, čaj, koka kola, čokolada	Na dan studije

FAKTORI KOJI MOGU POVEĆATI BHR	Trajanje efekta
Ekspozicija spoljnim antigenima	1-3 nedelje
Ekspozicija antigenima iz radne sredine	Mesecima
Respiratorne infekcije	3-6 nedelja
Aerozagađenje	1 nedelja
Dim cigarete	Nepoznato
Hemijski iritansi	Dani/nedelje

luaciju efekata lečenja. U grupu direktnih agonista ubrajaju se farmakološke supstance koje svoje dejstvo ostvaruju direktno na receptore glatkih mišića bronha, dovodeći do bronhospazma. Najčešće korišćeni agonisti su metaholin i histamin, koji daju sličan odgovor disajnih puteva, a zbog jednostavnosti interpretacije se obično posmatraju kao agonisti jednakog dejstva. Metaholin je sintetski derivat acetil-holina koji deluje preko muskarinskih receptora, dok histamin deluje preko histaminskih receptora koji su znatno šire zastupljeniji zbog čega je njegova primena udružena sa dodatnom stimulacijom senzornih vlakana i mukoznih žlezda (3). Zbog brzog metabolisanja u disajnim putevima i malog kumulativnog efekta, ovi agonisti ne dovode do kasnog bronhijalnog odgovora. Karbahol, acetilholin, leukotrijeni i prostaglandin D2 takođe spadaju u direktne agoniste, ali se oni koriste uglavnom u istraživačke svrhe.

Preporuke za izvođenje BPT date su još 2000. godine od strane Američkog torakalnog udruženja (3). Pre svakog testiranja potrebno je proceniti verovatnoću dijagnoze astme, na osnovu simptoma bolesti i plućne funkcije. Smatra se da test ima dijagnostičku vrednost ukoliko je predikcija za bolest procenjena pre testa u rangju između 30-70%. Najčešće se koriste dva standardizovana protokola; (i) 2-minutni metod mirnog disanja koji podrazumeva kontinuiranu inhalaciju aerosola metaholina uz pomoć *English Wright* nebulizatora kalibrisanog na nivo inhalacije od 0,13 ml/min u trajanju od 2 minute i (ii) dozimetrijski metod kod kojeg se inhalacija aerosola vrši sa 5 uzastopnih, dubokih inspirijuma, od nivoa funkcionalnog rezidualnog kapaciteta u trajanju od 6 sekundi. Ovaj metod podrazumeva korišćenje *DeVilbiss 646* nebulizatora sa nivoom inhalacije od 9 μ L pri svakoj aktivaciji. Testiranje se sprovodi sa postepeno rastućim koncentracijama (ili dozama) metaholina (ili histamina) prema ranije određenom protokolu (3). FEV1 (forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi ekspirijuma) se meri 30 sekundi i 90 sekundi nakon svake doze agonista. Testiranje se prekida ukoliko dođe do pada FEV1 $\geq$ 20% u odnosu na inicijalne vrednosti ili se postigne najviša koncentracija (ili doza) agonista (obično 8mg/mL ili 16 mg/mL). Na osnovu rezultata određuje se krivulja doza–odgovor, a zatim izračunava provokativna koncentracija (PC20) ili provokativna doza (PD20) agonista koja je dovela do pada vrednosti FEV1 za 20%. U zavisnosti od PC20, BHR se može stepenovati na tešku i srednje tešku (PC20 <1 mg/mL), laku (PC20 1-4 mg/mL), graničnu (PC20 4-16 mg/mL) i normalnu (PC20 >16 mg/mL). Ova gradacija ima kliničkog značaja i važna je za pravilnu interpretaciju rezultata testa. Direktni BPT imaju visoku senzitivnost, ali nisku specifičnost što znači da negativan BPT na 16 mg/mL (ili čak 8 mg/mL), kod pacijenata koji imaju simptome bolesti u momentu testiranja, može isključiti dijagnozu astme sa tačnošću koja se približava vrednosti od 100% (4). Sa druge strane, pozitivan nalaz testa je manje informativan. Zanimljiv je podatak da se PC20 na 8 mg/mL dobija

kod >50% slučajno odabranih ispitanika koji nemaju kliničke simptome bolesti (1) ili boluju od drugih bolesti kao što su alergijski rinitis, hronična opstruktivna bolest pluća, kardijalna dekompenzacija, pušenje i slično. Sa druge strane, specifičnost testa se povećava sa težinom BHR. Kod pacijenata koji imaju simptome bolesti i pozitivan nalaz testa na 1 mg/mL, dijagnoze astme se može postaviti sa sigurnošću od gotovo 100% (5). Za sve ostale vrednosti PC20 koje se kreću između 1mg/mL i 16 mg/mL, a rezultati testiranja se moraju uporediti sa simptomima i drugim pokazateljima.

Premda su metode direktne bronhoprovokacije dobro standardizovane i široko korišćene, danas postoje novi dokazi o tačnosti preporučenih protokola testiranja. Uprkos razlikama u volumenu administriranog aerosola i tehnikama inhalacije, prvobitne studije su pokazale da se metodom mirnog disanja i dozimetrijskom metodom dobijaju komparabilni rezultati (3). Cockcroft je međutim, u svojoj studiji dokazao da se primenom protokola mirnog disanja dobijaju niže vrednosti PC20 u odnosu na dozimetrijsku metodu (6). Kao razlog tome, navodi se veća administrirana doza agonista tokom mirnog disanja, ali i bronhoprotektivni efekat koji nastaje prilikom dubokog inspirijuma i zadržavanja vazduha u dozimetrijskoj metodi. Ovaj efekat nedostaje kod pacijenata sa astmom, ali je često prisutan u blagoj ili intermitentnoj bolesti, zbog čega razlika u odgovoru može značiti razliku u postavljanju ili isključivanju dijagnoze astme.

Nebulizatori preporučeni od strane ATS su zastareli, teško se nabavljaju i obično se ne koriste u svakodnevnoj praksi. Klasični nebulizatori (poput *English Wright*) su dizajnirani tako da operišu kontinuirano tokom celog disajnog ciklusa. Obzirom da inspirijum čini oko 1/3 disajnog ciklusa, 2/3 datog aerosola se gubi u okolinu, što za posledicu može imati ugrožavanje zdravlja okolnog medicinskog osoblja. Aparati novije generacije, poput *Aero-Eclipse II BAN* ili automatskih sistema za nebulizaciju (npr. *APS-Viasys*) se aktiviraju inspiratornim protokom. Na ovaj način praktično nema gubitaka aerosola, obezbeđena je ekonomičnija upotreba, brže sprovođenje testiranja i povećava bezbednost medicinskog osoblja. Coates je u svojoj studiji upoređivao performanse ovih nebulizatora i ustanovio da se pulmonalna depozicija aerosola postignuta tokom 2 minuta kontinuiranog disanja (primenom *English Wright* nebulizatora) postiže za 12 sekundi ukoliko se koristi *AeroEclipse II BAN* nebulizator, odnosno za 40 sekundi ako se koristi automatski nebulizator *Viasys* (7).

Kao što je ranije pomenuto, stepen bronhijalne hiperreaktivnosti određuje se na osnovu provokativne koncentracije metaholina ili histamina (PC20). U ispitivanju koje je izveo Bola sa saradnicima, upoređivan je efekat dobijen obredivanjem PC20 sa PD20 pri primeni različitih nebulizatora (*English Wright* i *AeroEclipse II BAN*) (8). Rezultati studije pokazuju statistički signifikantnu razliku u provokativnoj koncentraciji (PC20) pri primeni različitih ne-

bulizatora, koja se gubi ukoliko se odgovor procenjuje na osnovu provokativne doze (PD20) agonista.

Na Evropskom respiratornom kongresu održanom u septembru 2013. godine, istaknuta je neophodnost objavljivanja novih smernica za izvođenje bronhoprovokativnih testova, kao i potreba da se u svakodnevnu praksu inkorporiraju novi standardi. Prema ovoj preporuci, težinu bronhijalnog odgovora je potrebno određivati na osnovu PD20 umesto dosadašnjeg PC20, testovi se mogu izvoditi sa različitim nebulizatorima ukoliko su poznate njihove performanse, a dozimetrijska metoda nije više pogodna za izvođenja testa.

Indirektni bronhoprovokativni testovi

Indirektni BPT čine grupu različitih testova kod kojih se dokazuje reaktivnost glatkih mišića bronha na dejstvo endogeno oslobođenih medijatora. Indirektni agonisti dovode do aktivacije zapaljenskih i rezidentnih ćelija sluznice bronha kao i senzornih nerava tokom koje se oslobađaju medijatori (poput prostaglandina, leukotrijena i neuropeptida) koji imaju snažan bronhokonstriktorni efekat (9). Pozitivan test je u uskoj korelaciji sa astmatičnom inflamacijom, dok je kalibar disajnih puteva od manjeg značaja. Suprotno direktnim testovima, za indirektnu stimulaciju su potrebne visoke doze agonista (od 50-100X više), za većinu testova postoji gornji limit provokacije preko kojeg se testiranje ne sprovodi, a nakon testiranja dolazi do razvoja refrakternog perioda tokom kojeg se testiranje ne može ponavljati. Indirektna provokacija znatno bolje imitira fiziološke uslove razvoja bronhospazma od direktne provokacije, obzirom da većina spoljašnjih agenasa deluje upravo indirektno. Antiinflamatorna terapija i strategija izbegavanja alergena redukuju odgovor na indirektnu stimulaciju zbog čega se ova provokacija može koristiti kao indikator uspešnosti lečenja i stepena inflamacije disajnih puteva (10).

Bronhoprovokacija izazvana naporom

Bronhoopstrukcija izazvana naporom (eng. exercise-induced bronchoconstriction - EIB) je jedna od osnovnih karakteristika astme koja se često ispoljava kao prvi simptom bolesti ili pogoršanja. Poseban fenotip predstavlja naporom indukovana astma (eng. exercise-induced asthma - EIA) kod koje su simptomi uvek u vezi sa fizičkom aktivnošću (11). Ovaj fenotip je čest kod male dece i vrhunskih sportista, a njegovo otkrivanje je naročito značajno u pojedinim profesijama koje zahtevaju velika fizička naprezanja kao što su; vojska, policija, vatrogasna služba, profesionalni ronci i ostali. Procenjuje se da 90% obolelih od astme između 10% i 50% vrhunskih sportista imaju EIB (12).

U EIA, prvih nekoliko minuta fizičke aktivnosti prolazi bez tegoba. Simptomi se ispoljavaju posle 5-10 minuta

nastavka ili prekida aktivnosti, perzistiraju narednih 15-40 minuta, a zatim se povlače uz razvoj refrakternog perioda. Tokom refrakternog perioda, koji traje od 40 min do 2 sata fizička aktivnost se može obavljati bez većih teškoća (Figura 1). Kod pojedinih pacijenata može doći do razvoja kasne reakcije, trećeg do desetog sata nakon primarne, sa kliničkom slikom koja je obično teža u odnosu na primarnu (9).

Patofiziološka zbivanja odgovorna za razvoj bronhospazma tokom fizičkog napora nisu u potpunosti razjašnjena. Prema jednoj hipotezi, ekstremno povećanje ventilacije dovodi do naglog gubitka vode zbog vlaženja novopridošlog vazduha i dehidracije sluznice, uz povećanje osmolarnosti i oslobađanje medijatora inflamacije iz ma-

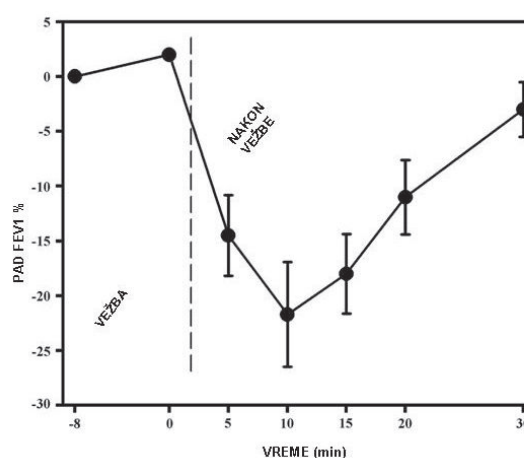


Figura 1. Tipične promene FEV1 tokom bronhoprovokacije naporom (15). Objašnjenje dato u tekstu.

stocita i eozinofila. Dodatno, aktivacijom osmoreceptora povećava se bronhijalni protok krvi i nastaje edem sluznice. Prema drugoj hipotezi, tokom fizičkog napora dolazi do hiperventilacije i prvobitnog hlađenja, a zatim zagrevanja sluznice bronha. Zbog naglog povećanja vaskularnog protoka razvija se edem sluznice, aktiviraju se rezidentne i infalamorne ćelije i oslobađaju se medijatori (10). Danas se ova hipoteza smatra manje verovatnom zbog činjenice da se EIB javlja i na temperaturama višim od 37 stepeni celzijusa. EIB je praćen porastom koncentracije leukotrijena (LTE4), prostaglandina D2 (PGD2) i histamina u urinu (9). Broj eozinofila u indukovanom sputumu može biti povišen, mada eozinofilija nije neophodan preduslov za nastanak EIB. Osim toga, dolazi do povećanog oslobađanja neuropeptida iz senzornih vlakana. Povećana sekrecija protektivnog prostaglandina (PGE1) nastaje naknadno i u korelaciji je sa razvojem bronhodilatacije i refrakternog perioda (9).

Pостоje različiti protokoli za izvođenje bronhoprovokacije naporom, od kojih se najčešće koristi protokoli preporučeni od strane ATS 2013. godine (13). Test se izvodi na bicikl-ergometru ili traci za trčanje u prostoriji koja ima određene mikroklimatske uslove; temperaturu od 20-25 stepeni celzijusa i nisku vlažnost vazduha (manju od 50%).

Pre testa je potrebno obustaviti primenu lekova, prema opštim uslovima (Tabela1), a dodatne se mora izbegavati teži fizički napor najmanje 4 sata pre testa. Testiranje se izvodi sa nosnim klipom zbog prevencije gubitka vode u gornjim disajnim putevima. Osnovni princip je brzo postizanje hiperventilacije, pri čemu se prati puls koji treba da dostigne 80-90% maksimalno predviđenih vrednosti u prvih 4-6 minuta testa. Smatra se da je test pravilno izveden ako se dostigne 40-50% maksimalne voljne ventilacije. Test traje 6 do 8 minuta nakon čega se sprovodi serija merenja FEV1 u 0, 3, 6, 10, 15 i 30 minutu. Pozitivan nalaz predstavlja pad FEV1 za 15% u odnosu na bazalne vrednosti (13).

Ispoljavanje EIB potenciraju spoljni faktori kao što su hladnoća, suv vazduh, aerozagađenje, alergeni i slično, a redukuju je inhalatorni kortikosteroidi (14). Lažno negativan BPT se može dobiti u stabilnoj fazi bolesti, tokom primene antiinflamatorne terapije ili kod vrhunskih sportista zbog nemogućnosti postizanja optimalnih uslova ili dostizanja submaksimalnog opterećenja u laboratorijskim uslovima. Danas je razvijena čitava grupa surogatnih testova koji omogućavaju identifikaciju EIB.

Surogatni testovi za identifikaciju bronhijalne hiperreaktivnosti provociranu naporom.

Bronhoprovakacija hipertoničnim slanim rastvorom se koristi za dokazivanje EIB i aktuelno aktivne astme kao i za potvrdu ranije otkrivene astme (13). Značajna indikacija je i hroničan, suv kašalj čija etiologija nije dokazana drugim testovima. Pozitivan test ukazuje na dijagnozu astme dok je negativan isključuje. Inhalacija hipertoničnog slanog rastvora dovodi do povećanja osmolarnosti periciliarnog fluida (slično efektu koji se dobija bronhoprovakacijom pri naporu) i oslobađanja medijatora iz mastocita i eozinofila. Dakle, osnovni preduslov za pozitivan nalaz je prisutna inflamacija astmatičnog tipa i reaktivnost glatkih mišića na endogeno oslobođene medijatore. Za testiranje se koristi ultrazvučni nebulizator maksimalnog protoka i 4,5% slani rastvor. Nakon izmerenih vrednosti FEV1, započinje se inhalacija slanog rastvora sa postepeno rastućim dužinama ekspozicije; inicijalno 30 sekundi, a zatim 1, 2, 4 i 8 minuta. Nakon svake ekspozicije meri se FEV1, a test se prekida u slučaju pada FEV1 za 15%. Ukoliko FEV1 padne za 10% ponavlja se ista ekspozicija. Test se prekida nakon 15,5 minuta ili 23 gr slanog rastvora (15). Na osnovu kumulativne doze dobija se dozno zavisni odgovor na osnovu koga se može odrediti težina EIB (Figura 2).

Bronhoprovakacija manitolom je takođe jedan od surogatnih testova za dijagnozu EIB. Manitol je prirodni šećer koji se ne resorbuje u disajnim putevima, a dovodi do hiperosmolarnog efekta i oslobađanja medijatora iz mastocita. Test je jednostavan za izvođenje, ne zahteva posebnu opremu i pogodan je za testiranje male dece i odr

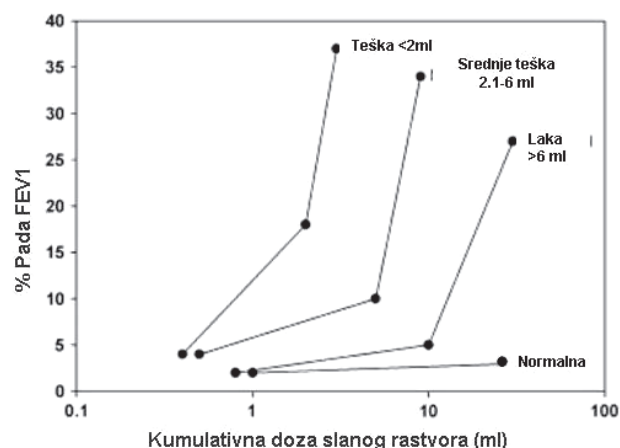


Figura 2. Dozno-zavisna krivulja kumulativne doze hipertoničnog slanog rastvora na osnovu koje se određuje težina EIB (15).

slih. Manitol se nalazi u vidu suvog praha u ranije pripremljenim kapsulama različitih doza, a inhalacija se vrši preko aparata za inhalaciju suvog praha. Testiranje se sprovodi sa postepeno rastućim dozama, od inicijalnih 5 mg do postizanja kumulativne doze od 635 mg manitola (prema rasporedu 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg, 160 mg, 160 mg i 160 mg). Test se prekida ranije ukoliko dođe do pada FEV1 za 15% u odnosu na inicijalne vrednosti ili za više od 10% između dve doze (15). Bronhoprovakacija manitolom dobro korelira sa srednje teškom BHR udruženom sa fizičkim naporom kao i inflamacijom disajnih puteva, prvenstveno sa brojem mastocita, dok je korelacija sa eozinofilijom manje konzistentna (16). Važno je napomenuti da se lažno negativan test otkriva u čak 30% pacijenata sa blagom BHR. Pozitivan metaholinski test uz negativan test sa manitolom kod pacijenta sa simptomima tokom fizičkog napora može ukazivati na iritativno oštećenje disajnih puteva i neutrofilnu inflamaciju, a ne na EIB. Negativan test kod ranije dijagnostikovane astme ukazuje na neaktivnu bolest i malu verovatnoću razvoja egzacerbacija (4).

Eukapnijska voljna hiperventilacija (EVH) se koristi za dijagnozu EIB u slučaju visoke sumnje na postojanje bolesti koja nije mogla biti dokazana jednostavnijim testovima kao što su manitolni test ili test sa hipertoničnim slanim rastvorom. Testiranje se izvodi udisanjem suvog vazduha iz velike, ne difundabilne vreće ispunjene smešom gasova (5%CO₂ i 21%O₂ balansirani azotom) u trajanju od 6 minuta, sa frekvencijom disanja od 30-60 u minuti. FEV1 se meri odmah po završetku testa i nakon 5, 10, 15 i 20 minuta. Pozitivan nalaz podrazumeva pad FEV1 za 10% u odnosu na inicijalne vrednosti (17). Test je naročito pogodan za ispitivanje EIB kod vrhunskih sportista i dobro utreniranih pojedinaca zbog velike respiratorne i kardijalne rezerve koja onemogućava optimalno fizičko opterećenje u laboratorijskim uslovima.

Zaključak

Kontrolisana provokacija disajnih puteva različitim nespecifičnim i specifičnim stimulansima može pružiti značajne podatke o funkciji glatkih mišića bronha i stepenu inflamacije. Standardi za izvođenje ovih testova postavljeni pre više godina danas se moraju menjati, u skladu sa novim saznanjima i boljom tehnologijom. Bronhoprovokativni testovi i dalje ostaju nezaobilazni u dijagnostici astme, praćenju efikasnost antiinflamatorne terapije i ispitivanju novih lekova.

Literatura

1. Cockcroft DW. Direct challenge tests. Airway hyperresponsiveness in asthma, its measurement and clinical significance. *Chest* 2010;138(2):18S–24S.
2. Pauwels R, Joos G, Van der Straeten M. Bronchial hyperresponsiveness is not bronchial hyperresponsiveness is not bronchial asthma. *Clin Allergy* 1988;184:317–321.
3. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(1):309–329.
4. Anderson SD. Indirect Challenge Tests: Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *Chest* 2010;138(2):25S–30S.
5. Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA, Gore BP. Sensitivity and specificity of histamine PC20 determination in a random selection of young college students. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89(1):23–30.
6. Cockcroft DW, Davis BE, Todd DC, Smycniuk AJ. Methacholine challenge: comparison of two methods. *Chest* 2005;127(3):839–844.
7. Coates AL, Leung K, Chan J, Ribeiro N, Charron M, Schuh S. Respiratory System Deposition with a Novel Aerosol Delivery System in Spontaneously Breathing Healthy Adults. *Respir Care*, published ahead of print, 2013,doi:10.4187/respcare.02455
8. Bola SS, Foty R, Marshall L, Nelligan K, Coates AL, Dell S et al. Provocative Dose 20, Not Provocative Concentration 20, Determines Bronchial Hyperresponsiveness in Children With Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:A2348.
9. Busse WW. The Relationship of Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation: Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *Chest* 2010;138(2):4S–10S.
10. Joos GF, O'Connor B, Anderson SD, et al. ERS Task Force: Indirect airway challenges. *Eur Respir J* 2003;21(6):1050–1068.
11. Anderson SD, Holzer K. Exercise-induced asthma: is it the right diagnosis in elite athletes? *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(3):419–28.
12. Rundell KW, Slee JB. Exercise and other indirect challenges to demonstrate asthma or exercise-induced bronchoconstriction in athletes. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122: 238–246.
13. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: Exercise-induced Bronchoconstriction. Parsons JP, Hallstrand TS, Mastronarde JG, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(9):1016–1027.
14. Duong M, Subbarao P, Adelroth E, et al. Sputum eosinophils and the response of exercise-induced bronchoconstriction to corticosteroid in asthma. *Chest* 2008;133:404–411.
15. Anderson SD, Brannan JD. Methods for “indirect” challenge test including exercise, eucapnic voluntary hyperpnea, and hypertonic aerosols. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;24:27–54
16. Brannan JD, Anderson SD, Perry CP, et al. The safety and efficacy of inhaled dry powder mannitol as a bronchial provocation test for airway hyperresponsiveness: a phase 3 comparison study with hypertonic (4.5%) saline. *Respir Res* 2005;6:144.
17. Porsbjerg C, Brannan JD, Anderson SD, Backer V. Relationship between airway responsiveness to mannitol and to methacholine and markers of airway inflammation, peak flow variability and quality of life in asthma patients. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1:43–50.

SAVREMENA DIJAGNOSTIKA BAKTERIJSKIH UZROČNIKA PLUĆNIH INFEKCIJA

CONTEMPORARY DIAGNOSTICS OF BACTERIAL PATHOGENS IN LUNG INFECTIONS

Kurucin Tatjana, Vukelić Anka, Hadnađev Mirjana, Trudić Anika, Kukavica Darinka, Kašiković- Lečić Svetlana

Korespondencija:

Dr sc. med. Tatjana Kurucin

CENTAR ZA MIKROBIOLOGIJU SA IMUNOLOGIJOM

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:20-27

SAŽETAK

Standardna klinička mikrobiološka praksa bazirana na osnovu fenotipske i biohemijske identifikacije mikroorganizama je u velikoj meri pomogla modernoj medicini, ali ovaj pristup ima svoja ograničenja. Brza identifikacija mikroorganizama ima ogroman značaj za primenu optimalnih mera za lečenje infekcija izazvanih bakterijama, virusima, gljivicama, mikobakterijama i parazitima. Metode za brzu detekciju bakterija, koje izazivaju infekcije i njihove rezistencije na antibiotike su značajno unapređene poslednjih decenija. Molekularne metode imaju visoku specifičnost i senzitivnost, pomoću njih se detektuje uzročnik direktno u materijalu, dobijaju se brzi rezultati i identifikuju novi uzročnici. Molekularne metode takođe omogućavaju brzu detekciju bakterijske rezistencije, diferenciranje toksigenih od netoksigenih sojeva i identifikaciju uzročnika koji su izgubili vijabilnost tokom transporta, koje je teško kultivisati, koji sporo rastu i koji se nalaze u veoma malom broju u kliničkom uzorku. Brza detekcija rezistentnih patogenih mikroorganizama je neophodna zbog izolacije pacijenata i prevencije daljeg širenja bolesti. Najčešće korištene molekularne metode su različite vrste reakcije lančane polimeraze - Polymerase Chain Reaction (PCR) (real-time PCR, multiplex real-time PCR), ciljano sekvencioniranje DNK (sekvencioniranje 16S rRNK gena), fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) i metode masene spektrometrije (MALDI –TOF- MS -matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). Pored molekularnih metoda, u upotrebi su i brze imunohromatohrafske metode, koje dokazuju prisutnost antigena uzročnika, sa visokim procentom senzitivnosti i specifičnosti i lako su za izvođenje. Uprkos brojnim prednostima brzih molekularnih i imunoloških metoda, metode zasnovane na kultivaciji, neće zastareti u bliskoj budućnosti.

Ključne reči: mikroorganizmi, molekularne metode, PCR, FISH, MALDI-TOF-MS

SUMMARY

The standard clinical microbiology practice, based on the phenotype and biochemical identification of microorganisms, has helped the modern medicine a lot, but this approach has its limits. Fast identification of microorganisms is exceptionally important to apply the optimal treatment measures for bacterial, viral, fungal, mycobacterial and parasitic infections. The fast identification methods of infection-inducing bacteria and their resistance to antibiotics have been significantly improved over the recent decades. The molecular methods are highly specific and sensitive, detecting the bacterial agent in the material directly, providing the results very fast, and identifying new agents. These methods also enable a fast detection of the bacterial resistance, differentiation of toxigenic and non-toxigenic strains, and identification of the strains losing their viability during transportation, which are difficult to be cultivated, grow slowly, and are present in small quantities in the clinical sample. Resistant pathogenic microorganisms are important to be detected fast to isolate the patient and prevent further spread of the disease. The most frequently applied molecular methods include diverse polymerase chain reactions (PCRs) (real-time PCR, multiplex real-time PCR), target DNA sequestration (16S rRNA gene sequencing), fluorescent in situ hybridization (FISH), and mass spectrometry methods (MALDI-TOF-MS).

– matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). Besides the molecular methods, the fast immunochromatographic methods have been also applied, which confirm the presence of the causing agent antigen with a high sensitivity and specificity, and are easy to perform. Despite the numerous advantages of fast molecular and immunological methods, the cultivation-based methods will not become obsolete in the near future.

Key words: microorganisms, molecular methods, PCR, FISH, MALDI-TOF-MS

Respiratorne infekcije su najčešći razlog za obraćanje lekaru u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Jedna trećina svih infekcija respiratornog trakta su infekcije donjeg respiratornog trakta sa incidencom od 44-50 na 1000. Etiologija akutnih infekcija donjeg respiratornog trakta je slabo razjašnjena, zbog ograničene detekcija uzročnika, a rezultat je neadekvatnog uzorkovanja i neadekvatne metodologije u otkrivanju uzročnika (1).

Brza identifikacija mikroorganizama u kliničkoj mikrobiološkoj laboratoriji može biti od velikog značaja za izbor optimalne strategije u borbi protiv infekcija izazvanih bakterijama, virusima, gljivicama, mikobakterijama i parazitima. Brza identifikacija mikroorganizama u kliničkim uzorcima omogućava celishodni izbor ciljane antibiotske terapije. Prilagođena terapija minimizira rizik od antibiotika-prekid normalne flore, toksične neželjene efekte i selektivni antibiotski pritisak. Zbog toga je neophodan razvoj i primena novih tehnologija u kliničkoj mikrobiologiji (2).

Standardna mikrobiološka praksa bazirana na osnovu fenotipske i biohemijske karakterizacije mikroorganizama je u velikoj meri pomogla modernoj medicini, ali ovaj pristup ima svoja ograničenja. Procenjuje se, da su 10 -20% kliničkih izolata, novi mikroorganizmi, koji se ne mogu dokazati fenotipski-baziranom identifikacijom. Molekularne tehnike su posebno pogodne za kliničku mikrobiologiju, jer ne zahtevaju kulturelnu identifikaciju, brzo se izvode, a digitalne genetske informacije mogu biti sačuvane u bazi podataka za epidemiološke studije. Ogroman tehnološki napredak u sekvencioniranju DNK je pokretač za genomsku i molekularnu dijagnostiku (3).

Molekularne metode imaju visoku specifičnost i senzitivnost, pomoću njih se detektuje uzročnik direktno u materijalu, dobijaju se brzi rezultati i identifikuju novi uzročnici. Ove metode pomažu tamo gde konvencionalne metode ne pružaju visok nivo pouzdanosti u identifikaciji, kod mikroorganizama koji dovode do epidemija i kod uzročnika koji su povezani sa nozokomijalnim prenošenjem. Molekularne metode takođe omogućavaju brzu detekciju bakterijske rezistencije, diferenciranje toksigenih od netoksigenih sojeva i identifikaciju uzročnika koji su izgubili vijabilnost tokom transporta, koje je teško kultivisati, koji sporo rastu i koji se nalaze u veoma malom broju u kliničkom uzorku (4).

Istorijski gledano, lečenje infektivnih bolesti je bilo veoma teško zbog nedovoljnog znanja, što je dovelo do širenja bolesti i masovnog umiranja. Unazad 150 godina, Luj

Paster je postavio teoriju, kojom je objasnio kako se zarazne bolesti mogu širiti među ljudima. Oko 25 godina kasnije, 1876.god., Robert Koh je prvi dokazao kako *Bacillus anthracis* može inficirati ovce, a kasnije je otkrio uzročnike tuberkuloze i kolere. 1884.god., Hans Christian Gram je razvio tehniku za razlikovanje Gram-pozitivnih od Gram-negativnih bakterija pomoću njihove sposobnosti da zadržavaju boju kristal violet. Nakon otkrića strukture DNK molekule, 1953.god., počinje era molekularne dijagnostike infektivnih bolesti bazirana na nukleinskim kiselinama. Ova dijagnostika obuhvata detekciju i karakterizaciju i bakterijskih i virusnih infekcija koristeći DNK/RNK metode. Četiri glavne tehnike koje su inicirale i stvorile platformu za razvitak novih tehnologija su enzimska DNK restrikcija, hibridizacija nukleinskih kiselina, reakcija lančane polimeraze (PCR) i metode bazirane na fluorescenciji (5).

Dokazivanje etioloških agenasa u infektivnim bolestima značajno poboljšava lečenje pacijenata uvođenjem specifično usmerene antibiotske terapije. Kliničke mikrobiološke laboratorije širom sveta se oslanjaju na fenotipskim metodama (kultura i biohemijski testovi) za detekciju i identifikaciju osobina virulencije (npr. geni za antibiotiku rezistenciju, toksini) kod humanih patogena. Populacija širom sveta je u povećanom riziku od obolevanja od novih zaraznih bolesti, naročito zoonoza ili bakterijskih uzročnika koji nose stečene gene antibiotske rezistencije. Široka upotreba visoko senzitivnih molekularnih tehnologija za najčešće uzročnike infekcija je takođe otkrila da ove bolesti nisu izazvane samo jednim uzročnikom, kako se ranije mislilo (6).

Dijagnoza bakterijskih infekcija u laboratoriji zasniva se na izolaciji bakterije, njenoj identifikaciji i antibiogramu. Ovaj dijagnostički pristup je limitiran činjenicom da rezultati kulture kasne i često su dostupni nakon davanja terapije, da postoje bakterije koje se ne mogu kultivisati zbog postojanja inhibitora, kao što su antibiotici ili neodgovarajući uslovi kultivisanja. Oko 75% bakterijskih vrsta crevne flore se ne može identifikovati rutinskim kulturelnim tehnikama (7).

Pored kulturelnog i biohemijskog dokazivanja bakterijskih uzročnika, razvijene su i indirektno metode detekcije bakterijske infekcije. Najzastupljenije su serološke metode, kojima se dokazuju ili antigeni ili antitela u ispitivanom uzorku. Pouzdanost ovih metoda nije bila zadovoljavajuća za konačno postavljanje etiološke dijagnoze, te se stvorila potreba za uvođenje novih senzitivnijih i specifičnijih metoda.

Reakcija lančane polimerize - Polymerase Chain Reaction (PCR) se razvila pre otprilike 20 godina i napravila je važan napredak u molekularnoj dijagnostici, jer je omogućena brza amplifikacija DNK (5). To je metoda koja umnožava molekul DNK i koja omogućava stvaranje velikog broja kopija koristeći mali početni uzorak DNK. DNK polimeraza se prirodno javlja u živim organizmima, u kojima ima funkciju da kopira DNK kada se ćelija deli tokom mejoze i mitoze. Polimeraza kopira tako što se veže na jedan, od dva polinukleotidna lanca koji čine DNK i stvara lanac komplementaran originalu (8). PCR testovi brzo i precizno detektuju prisustvo mikroorganizama direktno u kliničkom uzorku, uključujući i one koji imaju posebne potrebe za rast i koji sporo rastu. PCR se takođe upotrebljava za dokazivanje prisustva gena rezistencije na antibiotike u uzorku. Preduslov za dijagnostiku bakterijskih infekcija upotrebom PCR je ekstrahovanje DNK bez prisustva bilo kakvih polimeraza inhibitornih supstanci. Na izvođenje većine dijagnostičkih metoda baziranih na nukleinskim kiselinama utiče čistoća ciljane nukleinske kiseline. Način prečišćavanja zavisi od metode koja se upotrebljava i da li je cilj otkrivanje ili kvantifikacija. Značajan faktor koji doprinosi izboru tehnike za ekstrakciju nukleinske kiseline je izvor bakterijske ćelije: da li je ona iz kulture, brisa nosa, ili je uzorak stolica, krv, sputum i dr. Nove tehnike za ekstrakciju imaju prednost, jer su brze i otklanjaju svaki inhibitor koji može stvoriti problem pri predstojećoj detekciji. Za dijagnozu infektivnih bolesti razvijeni su različiti testovi bazirani na PCR tehnici (5).

Upotreba **real-time PCR** u kliničkoj mikrobiologiji se veoma brzo razvija, jer je jednostavna, specifična, senzitivna i brza metoda. Ova tehnika obuhvata i amplifikaciju i fluorescentnu detekciju u istom koraku. Takođe je smanjen rizik od kontaminacije, jer se analiza izvodi u istom aparatu. Usavršavanje opreme za real-time PCR je smanjilo amplifikaciju i detekciju za manje od 1čas (5). Real-time PCR je inovacija koja omogućava detekciju i kvantifikaciju amplifikovane DNK odstranjujući potrebu za dugotrajnim postamplifikacionim procesima (npr. gel elektroforeza). Fluorescentni signal se proizvodi u toku svakog ciklusa amplifikacije, kao posledica prajmerom-usmerene sinteze; intenzitet signala se povećava srazmerno broju generisanih amplifikovanih produkata. Prednost real-time PCR nad standardnim metodama, kao što su radioimunoezaj ili kulturelne metode, je dobro proučen i opisan u mnogim radovima. Ova metoda je superiorna u senzitivnosti, vreme za izvođenje testa je značajno smanjeno, a najznačajnije je da on ima izuzetno širok dinamički opseg. Limitiranost kod ove procedure je slična sa ostalim PCR tehnikama, i uključuje mogućnost inhibicije polimeraze prisustvom izvesnih komponenti i postojanjem rizika od detektovanja kontaminantne DNK zbog visoke senzitivnosti ove metode (9). Lažno pozitivni rezultati mogu nastati zbog kontaminacije nukleinske kiseline od drugih

kliničkih uzoraka i PCR produkata od predhodne amplifikacije. Lažno negativni rezultati mogu nastati zbog smanjene senzitivnosti PCR sistema ili zbog prisustva DNK ili RNK polimeraza inhibitora (uglavnom različiti faktori u krvi) u kliničkim uzorcima.

Pneumonija je jedna od najčešćih infektivnih bolesti i kod odraslih i kod dece. Uprkos napretku u dijagnostici, etiološka dijagnoza pneumonije se retko postavlja sa potpunom preciznošću. Čak i u strogo kontrolisanim studijama, veoma je teško postaviti etiološku dijagnozu, koja se postavlja samo u 50% slučajeva vanbolnički stečene pneumonije. U svakodnevnom radu, taj procenat je značajno niži. *S.pneumoniae* je najčešći uzočnik vanbolnički stečene pneumonije i kod dece i kod odraslih. Definitivnu dijagnozu pneumokone pneumonije je teško utvrditi konvencionalnim dijagnostičkim testovima. Hemokulture imaju slabu senzitivnost, a izolacija *S.pneumoniae* iz sputuma može predstavljati i orofaringeanu kolonizaciju. Pneumokokni urinarni antigenski test ima svoje prednosti, ali je manje pouzdan kod dece. Većina studija o *S.pneumoniae* PCR je fokusirana na testiranje uzoraka krvi (cele krvi, seruma ili plazme) u cilju otkrivanja skrivene pneumokokne bakterijemije. U novijim studijama opisana je upotreba PCR za detekciju *S.pneumoniae* u respiratornim uzorcima i stopa PCR pozitivnosti je bila visoka (83%-100%) (10).

Mycoplasma pneumoniae je mikroorganizam sa posebnim zahtevima za rast i zahteva dužu inkubaciju. Dijagnoza infekcije izazvane ovom bakterijom se uglavnom bazira na serološkim testovima. PCR je mnogo senzitivnija i znatno brža metoda od kulture, a generalno postoji dobra korelacija između rezultata PCR i seroloških testova (10).

Legionella species ne kolonizuje respiratorni trakt, pa detekcija ovih bakterija u kliničkim uzorcima ukazuje na infekciju. Zbog postojanja brojnih nedostataka drugih dijagnostičkih testova, ispitivan je značaj PCR u dijagnostici legineloza. Glavna mana kod ispitivanja uzoraka sputuma je to, što manje od polovine bolesnika sa legionarskom bolešću proizvodi sputum. Kada se koristi urin kao uzorak, senzitivnost PCR metode je 46%-86%. Senzitivnost za uzorke seruma je samo 30%-43%(10).

Upotreba kulture ćelija za detekciju *Chlamydia pneumoniae* je tehnički zahtevan i dugotrajan proces, pa se dijagnoza infekcija izazvanih ovom bakterijom zasniva na serološkom testiranju koje koristi mikroimunofluorescenciju. U principu, PCR bi trebao da bude osetljiv bar kao kultura, ali je teško proceniti specifičnost, jer nedostaje odgovarajući "zlatni standard".

C. pneumoniae DNK se može otkriti u uzorcima i gornjeg i donjeg respiratornog trakta, ali još nije jasno koji je respiratorni uzorak najpogodniji za PCR testiranje (10).

Zastupljenost infekcija uzrokovanih metilicilin rezistentnim *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistentnim

Tabela 1. PCR testovi koji se koriste za dokazivanje uzročnika pneumonija (10).

Uzročnik	Ciljani gen	Tip uzorka	Komentar
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumolizin, autolizin	Sputum, bris grla, serum, plazma, leukociti, urin, TIA	Problem je razgraničiti kolonizaciju od infekcije kada se testiraju respiratorni uzorci; varijabilna senzitivnost za uzorke krvi
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	P1 adhezija, 16 SrRNA, ATP-aza operon	Sputum, nazofaringealni bris, bris grla, BAL, TIA	Mnogo senzitivnije nego kultura, bris grla može biti najbolje izabrani uzorak
<i>Legionella species</i>	5SrRNA, 16 SrRNA, mip	Sputum, BAL, ETA, bris grla, serum, leukociti, urin	Senzitivnost kao kultura kada se testiraju uzorci iz donjeg resp. trakta
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Klonirani PstI fragment, 16 SrRNA, MOMP, 53kDa protein, 60hDA protein, 16S-23S spacer rRNA	Sputum, nazofaringealni bris, bris grla, BAL, oralni ispirak	Mnogo senzitivnije od kulture
<i>Chlamydia psittaci</i>	MOMP, 16 SrRNA, gseA	Sputum, bris grla, krv, tkivo pluća	Nije široko evaluirano
<i>Pneumocystis carinii</i>	Mitohondrijalna rRNA, 18SrRNA, 5SrRNA, thimidilat sintaza, dihidrofolat reduktaza, MSG	Sputum, bris grla, krv, tkivo pluća, oralni ispirak, BAL, ETA	Može biti korisno kada postoji klinička sumnja, a citopatološki rezultati negativni
Virusi	Različiti	Nazofaringealni i bris grla, sputum, BAL	Nije široko evaluirano kod pneumonija, više je upotrebljavano kod imunokompromitovanih pacijenata

TIA-transtorakalna iglena aspiracija; BAL-bronhoalevolarna lavaža; ETA-endotrahealni aspirat

stentnim *Enterococcus species* (VRE) je u porastu u svim bolnicama širom sveta. U jednoj studiji o stopi rezistencije u 670 američkih bolnica, pokazana je povećana pojava MRSA od 66% i povećano pojavljivanje VRE na 48% (11). Dosadašnje kulturne tehnike su veoma spore, a brze i senzitivne metode, kao real-time PCR omogućavaju da se može sprečiti širenje ovako rezistentnih sojeva. Opisan je senzitivni i specifičan test za brzu detekciju MRSA direktno iz uzoraka brisa nosa, koji je baziran na real-time PCR. Vreme od uzorkovanja do dobijanja rezultata je samo 1,5h (12). Uprkos svim prednostima, ograničenje za primenu ove tehnike u manjim laboratorijama je cena aparata, a cena jedne real-time PCR reakcije, uključujući DNK ekstrakciju, može biti više od tri puta skuplja od konvencionalnog PCR. U skoroj budućnosti, kliničke laboratorije će biti u mogućnosti da izvode različite tipove multiplex real-time PCR testova za trijažu, detekciju ili bolnički nadzor u istom automatizovanom sistemu (6).

Ciljano sekvencioniranje DNK (DNA target sequencing): Sekvencioniranje nukleinskih kiselina je postala važna tehnika za identifikaciju i otkrivanje patogenih uzročnika. Identifikacija ljudskih patogenih uzročnika putem delimičnog ili celog sekvencioniranja gena nije bilo široko prihvaćeno u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama

ma zadnjih decenija, zbog samog procesa rada i troškova uvođenja ove tehnologije, nedostatka standardizovanih metoda za sprovođenje analiza i tumačenje rezultata (6). Pre 2000. godine, metoda ciljanog sekvencioniranja DNK je prvenstveno bila korištena za identifikaciju organizama koji su bili teški za identifikaciju upotrebom konvencionalnih fenotipskih metoda ili kultivacijom (13). Jedan od značajnih molekula u molekularnoj dijagnostici bakterijskih infekcija je 16S rRNA gen. Ovaj gen je prisutan u svim bakterijama i kodira isti produkt kod svih bakterija. On sadrži mnoge domene od kojih su neki stalni, a neki varijabilni (5). Parcijalno sekvencioniranje 16S rRNA gena je dovoljno za identifikaciju bakterija i pokazano je da je sekvencioniranje 5' kraja 16S rRNA dovoljno za identifikaciju, do nivoa vrste, većine klinički značajnih *Mycobacterium* izolata (14). Novi organizmi nepoznate ili loše definisane patogenosti se amplifikuju iz uzoraka pacijenata kada se ciljaju 16S rRNA geni. Pored toga, nevarijabilne bakterijske DNK se mogu detektovati nakon započinjanja antibiotske terapije, što može biti dijagnostička prednost, ako bakterije nisu izolovane iz uzorka. (15). Više istraživača je poredilo sekvencioniranje 16S rRNA gena ili gljivičnog ITS gena sa konvencionalnim fenotipskim metodama i komercijalnim automatizovanim sistemima za identifikaciju humanih patogenih uzročnika. Ciljano se-

kvencioniranje DNK omogućava višu stopu identifikacije do nivoa vrste nego fenotipski metod sa tačnošću između 62% do čak 92% u zavisnosti od grupe ispitivane bakterije i kriterijuma koji su uporebljeni za definisanje vrste (16). Sekvencioniranje ima i nekih ograničenja. Nije moguća identifikacija više patogena i determinisanje iz mnoštva različitih mikroorganizama, pa se zahteva upotreba in situ hibridizacije ili neke slične metode. Ove tehnike zahtevaju da kliničari znaju šta traže u uzorku (14).

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je metoda koja se danas široko upotrebljava za identifikaciju, vizualizaciju i lokalizaciju mikroorganizama na mnogim poljima mikrobiologije. FISH je prvobitno primenjen za ispitivanje uzoraka iz spoljašnje sredine, ali danas ovaj metod ima primenu u mikrobiološkoj dijagnostici, za brzu identifikaciju i direktnu vizualizaciju bakterija (17). FISH je bazirana na kratkim oligonukleotidima koji su komplementarni sa rRNK označenom sekvencom i daje fluorescenciju tokom spajanja molekule na 3' ili 5' kraj. Upotrebljavaju se i polinukleotidne probe i obeležavanje sa više fluorohromnih molekula. Probe ciljaju specifičnu komplementarnu sekvencu na rRNK u intaktnoj ćeliji. U kombinaciji sa fluorescentnim mikroskopijama ili *confocal laser scanning* mikroskopijom (CLSM) moguće je, ne samo identifikovati organizam, već i otkriti njegovu preciznu lokaciju u trodimenzionalnom okruženju. FISH je brza metoda za vizualizaciju i identifikaciju bakterija direktno u uzorcima koji se ispituju, a moguće je otkriti vrste koje se ne mogu kultivisati (5).

Kod pacijenata sa cističnom fibrozom, veoma je značajno, između ostalog, znati koja je bakterijska vrsta prisutna u sputumu pacijenta i determinisati dominantni soj kako bi se lečenje što pre započelo. U ovim slučajevima FISH je označen kao brza i specifična metoda u kombinaciji sa standardnim postupcima identifikacije i određivanjem osetljivosti na antibiotike. Ovim metodom se brzo i specifično identifikuje *Pseudomonas aeruginosa* u respiratornim sekretima (18). Na ovaj način se može odrediti aktivnost bakterija u mladim i starim biofilmovima koje formiraju sulfat-redukujuće bakterije. Bakterije u starim biofilmovima imaju bolju aktivnost rasta nego bakterije u mladim biofilmovima. Merjenja bazirana na FISH tehnologiji mogu se primeniti na biofilme koji nastaju u ljudskom organizmu u dodiru sa implantatima. Procena aktivnosti rasta u ovom slučaju daje bolji uvid u aktivnu bakterijsku populaciju, pa se može upotrebiti preciznije i direktno lečenje (5).

Peptide Nucleic Acid Fluorescent in situ Hybridization (PNA-FISH) može da razgraniči *S.aureus* od koagulaze negativnog stafilokoka direktno u uzorku. Primena ove strategije je povezana sa smanjenjem bolničkih troškova za oko 4000 \$ po pacijentu, skraćenjem hospitalizacije za 2 dana i smanjenjem upotrebe vankomicina. Upotrebom ove tehnike došlo je do značajnog pada mortaliteta u jedi-

nici intenzivne nege (JIN) sa 47,8% na 9,5% (19).

MALDI –TOF- MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) je vrsta masene spektrometrije, koja omogućava skrining proteina direktno iz intaktnih bakterija. To je nova tehnologija za rutinsku identifikaciju bakterija u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama. Brza je i ekonomična metoda, jednostavna za korišćenje. Za kratko vreme ona je široko prihvaćena i integrisana u mnoge kliničke mikrobiološke laboratorije. Pošto detektuje širok spektar proteina, ova tehnika je sposobna da napravi razliku među srodnim vrstama i da klasifikuje organizme na nivou vrste (20). Ćelijske komponente koje se detektuju su uglavnom proteini, a takođe i lipidi i polisaharidi. Proteini koji se detektuju su oni koji su ekstraktibilni, rastvorljivi, umereno hidrofilni, stabilni i obilno prisutni. Oni su u rasponu od 2000-20000 mase i to su uglavnom ribozomalni proteini. Kada se koristi za testiranje kolonija, potrebno je svega nekoliko minuta da se dobije identifikacija, koja ponekad ne daje samo identifikaciju mikroorganizma na nivou vrste, već i na nivou subvrste, omogućavajući određivanje epidemiološke povezanosti. Može se određivati rezistencija na antibiotike i neki bakterijski toksini (21). Dokazano je da se, kod rutinskih bakterijskih izolata, korektna identifikacija sa MALDI –TOF- MS, do nivoa vrste, dobija u 84.1-93.6% (22).

Bacteroides fragilis i srodne vrste su oportunistički, Gram-negativni, anaerobni bacili koji uzrokuju teške infekcije, između kojih plućni apsces i sepsu, a bakterijemija izazvana ovom bakterijom umnogome utiče na morbiditet i mortalitet. Infekcije koje izazivaju *Bacteroides* vrste, same ili u mešanoj kulturi, imaju sposobnost da postanu rezistentne na različite grupe antibiotika, a rezistencija na pojedine antibiotike je uvek veoma visoka. Korektna identifikacija *Bacteroides* na nivou vrste je neophodna, jer se rezistencija na različite antibiotike razlikuje među vrstama. U ovom slučaju, kao i u slučaju ostalih anaerobnih bakterija koje izazivaju različite infekcije, a koje se veoma teško identifikuju fenotipskim metodama, MALDI –TOF- MS je veoma preporučljiva tehnika (22).

Legionella species su fakultativne, intacelularne bakterije koje inficiraju makrofage. Ova bakterija, sa probiljivim zahtevima za rast, najčešće izaziva plućne infekcije i rutinski se dokazuje različitim molekularnim metodama, najčešće PCR ciljanjem mip gena i sekvencioniranjem, što je skupo i zahteva duže vreme. Moliner i sar. (23) su opisali upotrebu MALDI –TOF- MS za brzu identifikaciju vrsta i serogrupa kod 21 *Legionella* vrsta za koje se zna da izazivaju infekcije kod ljudi. 94,1% sojeva je korektno identifikovano do nivoa vrste. Fujinami i sar. (24) su upotrebili dva molekularna metoda za tipiziranje- elektroforezu u pulsirajućem polju (PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis) i MALDI –TOF- MS za razlikovanje 23 vrste *L.pneumophila*. U ovoj studiji, MALDI –TOF- MS rezulta-

ti su dobijeni u okviru nekoliko sati od inicijalne kulture, dok su PFGE analize zahtevale nekoliko dana da budu kompletirane.

El Khéchine i sar.(25) su opisali upotrebu MALDI – TOF- MS za rutinsku identifikaciju mikobakterija iz uzoraka pacijenata sa plućnom tuberkulozom. Zaključno, MALDI –TOF- MS je veoma moćna tehnika za klasifikovanje bakterija koje je teško kultivisati.

Mikrobiološka dijagnoza je od presudnog značaja za lečenje bolnički stečenih pneumonija i kod ventilatorom povezane pneumonije (ventilator-associated pneumonia-VAP). Mnoge studije govore da rana, ciljano antimikrobna terapija poboljšava terapijski ishod. Najčešći uzročnici bolnički stečenih pneumonija i ventilatorom povezane pneumonije su *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter species* i razne Gram-negativne bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* (najčešće *Klebsiella pneumoniae*). I u ovom slučaju, metode identifikacije, bazirane na nukleinskim kiselinama, omogućavaju veću senzitivnost i specifičnost nego tradicionalne mikrobiološke tehnike. U poslednje vreme i tehnike bazirane na masenoj spektrometriji sve se više upotrebljavaju za ova teška stanja (26).

Kao brzi, nemolekularni testovi, imunohromatografski testovi su prvi put opisani 1960-tih godina i u početku su nastali da bi odredili prisustvo serumskih proteina. Druge rane analize koje su koristile imunohromatografske tehnike uključivale su one za kvantifikaciju lekova u biološkim tečnostima, teofilina u punoj krvi i mišijih imunoglobulina. U poslednjih desetak godina opisane su mnoge imunohromatografske tehnike za detekciju infektivnih bolesti, kancera, kardiovaskularnih bolesti, pankreatitisa i nedozvoljenih lekova. Ovi testovi su brzi, zahtevaju oko 15 min. za očitavanje, jednostavni su za upotrebu, zahtevaju samo razblaženje testiranog uzorka u puferu i aplikaciju nekoliko kapi (oko 200 µL) na test strip. Ovaj test sadrži koloidnim zlatom obeležena antitela osušena na filter podlogu koja je fiksirana na nitrocelulozni strip. Zarobljena antitela su nanešena na liniju stripa i osušena. Za izvođenje testa, uzorak se rastvori u puferu i doda na podlogu koja sadrži koloidnim zlatom obeležena antitela. Antitela se specifično vezuju za antigene prisutne u uzor-

ku, što rezultira kompleksom na membrani gde se vezuje za antitela. Pozitivna reakcija je vidljiva kao crvena linija stvorena vezivanjem za koloidno zlato. Sadašnje generacije testova imaju i neka ograničenja. Samo jedan uzročnik može biti identifikovan na jednom test stripu. Svaki test ima varirajući nivo senzitivnosti u zavisnosti od ciljanog agensa. Testovi za bakterijske agense su veoma senzitivni, sposobni da detektuju od 2×10^5 do 2×10^6 CFU/ml. Pošto se ovaj test vidi kao crvena linija, senzitivnost je limitirana subjektivnošću (šta ljudsko oko vidi) (27).

Za brzo dokazivanje *S.pneumoniae* antigena iz uzoraka urina i likvora koristi se imunohromatografski membranski test. Ovaj test se, u određenim slučajevima, može primeniti i za bronhoalveolarnu lavažu (BAL), kao i za epidemiološke studije (28). Za dokazivanje uzročnika respiratornih infekcija, predstavljena su tri brza testa, koji detektuju antigene virusa influence, *Streptococcus pneumoniae* i *Legionella species*. Pneumokokni brzi test detektuje *Streptococcus pneumoniae* kod nekih pacijenata sa negativnim kulturama (senzitivnost 50-80%; specifičnost 90%). Senzitivnost urinskog antigenskog testa direktno zavisi od težine bolesti. Problem za postavljanje dijagnoze je kod male dece, jer više od 20% mogu nositi pneumokoke kao deo komenzalne flore i ovo može dovesti do lažno pozitivnih rezultata. *Legionella pneumophila* serotip 1 je odgovorna za oko 60-70% respiratornih infekcija. Kulturno ispitivanje obično zahteva 3-7 dana, a sa druge strane infekcija može biti perakutna i fatalna i zahteva specijalno lečenje (makrolidi ili fluorohinoloni). U prilog brzom dijagnozi, određivanje legionela antigena u urinu ima veliki klinički značaj. Senzitivnost ovog testa je oko 94%, a specifičnost 99-100%. Infekcije sa drugim serotipovima se mogu detektovati putem ukrštenih reakcija, pa je senzitivnost niža (oko 80%). Za beta-hemolitične streptokoke, brzi testovi su dostupni za direktnu detekciju antigena grupe A streptokoka (*S. pyogenes*) i grupe B streptokoka (*S. agalactiae*). Test se bazira na ekstrakciji C-antigena iz ćelijskog zida, a zatim sledi imunološka reakcija. Specifičnost je >85%. Imunohromatografski testovi pomažu bržem postavljanju dijagnoze i započinjanju rane specifične antimikrobne terapije ili profilakse (29).

Umesto zaključka:

Tabela 2. Dijagnostički testovi za bakterijske uzročnike infekcija donjeg respiratornog trakta (30)

Uzročnik	Dostupni testovi	Komentar
<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , Gram-negativni bacili	Gram bojenje i kultura sputuma, BAL-a ili drugih dubokih resp. sekreta; Gram bojenje i kultura pleuralnog punktata; hemokultura	Urinarni <i>S. pneumoniae</i> antigen test-visoka specifičnost; senzitivnost 52-80%
<i>Legionella</i> species	Kultura respiratornih sekreta na selektivnoj BCYE podlozi	Smatra se „zlatni standard“
	Detekcija urinskog antigena	Detektuje se samo <i>L. pneumophila</i> serogrupa 1
	Serologija	Potrebno 1-3 meseca za sero konverziju
		Najviše obećava
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PCR sa respiratornim sekretima	
	Serologija	Metod izbora
	Kultura	Retko se izvodi, zahteva spec. podloge, produžena inkubacija
	PCR	Radi se samo u referentnim laboratorijama
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Serologija	MIF je najbolji test
	Kultura	Nije široko u upotrebi ; Senzitivnost 50-70%
	PCR	
<i>Bordetella</i> species	Kultura	Nazofaringealni bris, aspirati, ispirci su najbolji uzorci; zahtevaju spec. podloge za transport i kulturu
	DIF	Senzitivnost 65%, specifičnost 99.6% sa reagensima od monoklonalnih antitela
	Serologija	IgA i IgG antitela
	PCR	Brza, senzitivna metoda; brisevi sa kalcijum alginatom su inhibitorni za PCR
<i>Nocardia</i> species	Bojenje po Gram-u i modifikovano acido-alkoholno bojenje; kultura respiratornih uzoraka i tkiva	
<i>Mycobacterium</i> species	Acido-alkoholno bojenje; kultura u kombinaciji tečne i čvrste podloge	
	Direktne amplifikacione tehnike	Odobreno od FDA: Gen-Probe AMTDT i Roche Amplicor and COBAS testovi

Literatura:

1. Creer DD et al. Aetiological role of viral and bacterial infections in acute adult lower respiratory tract infection (LRTI) in primary care. *Thorax*. 2006;61:75–79.
2. Wolk DM, Michael Dunne W, Jr. New Technologies in Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(9Suppl). S 62-S 67
3. Zhang WW, Versalovic J. Expanding the Diagnostic Capabilities of Molecular Microbiology by Genomic Methods. *JMD*. 2007; 9(5): 572-573
4. Rao S. Molecular techniques in clinical microbiology. [cited 2013. Aug.28] Available from http://www.microrao.com/micronotes/pg/molecular_techniques.pdf
5. Barken KB, Haagansen JAJ, Tolker-Nielsen T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta*. 2007; 384: 1-11
6. Sibley CD, Peirano G, Church LD. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12: 505-521
7. Candela M et al. High taxonomic level fingerprint of the human intestinal microbiota by Ligase Detection Reaction-Universal Array approach. *BMC Microbiol*. 2010; 10:16
8. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitation, and future application in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4: 337-48
9. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005; 29: 151-9
10. Diekma DJ et al. Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 78-85
11. Warren DK et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 5578-81
12. Pareek CS et al. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011; 52 (4): 413-435
13. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn*. 2001; 6:313-21
14. Sontakke S et al. Use of broad range 16S rRNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 2009; 76: 217-225
15. Simmon KE et al. Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(5): 1596-1601
16. Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Curr Opin Biotechnol*. 2001; 12:231-6
17. Wellinghausen N et al. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4070-5
18. Wolk DM, Dunne WM Jr. New Technologies in Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (9 Suppl.): S62-S67
19. Murray, P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect*. 2010;16 (11): 1626–1630.
20. Harris P, Winney I, Ashhurst-Smith C, O'Brien M, Graves S. Comparison of Vitek MS (MALDI-TOF) to standard routine identification methods: an advance but no panacea. *Pathology*. 2012 ; 44(6): 583-5
21. Biswas S, Rolan J-M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods*. 2013;92 (1): 14-24
22. Moliner Et al. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2010; 59: 273-284
23. Fujinami et al. Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*. 2011; 166 (2): 77-86
24. El Khéchine et al. by matrix-assisted laser desorption /ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*. 2011;6(9): [cited 2013. Aug.28] Available from <http://www.plosone.org>
25. Lung M, Codina G. Molecular diagnosis in HAP/VAP. *Curr Opin Crit Care*. 2012; 18:487-494
26. Peruski AH, Peruski LF Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Diseases and Biological Warfare Agents. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10 (4):506-513
27. Jacobs JA et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* Antigen in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples by a Rapid Immunochromatographic Membrane Assay. *J Clin Microbiology*. 2005; 43 (8): 4037-4040
28. Stürenburg E, Junker R. Point-of-Care Testing in Microbiology. *Dtsch Arztebl Int*. 2008; 106 (4): 48-54
29. Carroll KC. Laboratory Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections: Controversy and Conundrums. *J Clin Microbiol*. 2002; 40 (9): p.3115-3120

ULOGA MOLEKULARNIH TESTOVA U SAVREMENOJ DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE

THE ROLE OF MOLECULAR TESTING IN CONTEMPORARY TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC

Popović Gordana, Kuruc Vesna, Vukelić Anka

Korespondencija:

Dr sc. med. Gordana Popović

KLINIKA ZA PULMOLOŠKU ONKOLOGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:28-31

SAŽETAK

Potreba za razvojem bržih laboratorijskih dijagnostičkih metoda je uslovljena, između ostalog, i sve većim problemom rezistentne tuberkuloze. Što se ranije utvrdi da li je bacil senzitivna ili rezistentna na pojedine antituberkulotike, ranije se može i započeti odgovarajuće lečenje. Skraćivanje mikobakteriološke dijagnostike tuberkuloze je postignuto primenom tečnih podloga sa različitim osetljivim sistemima za ranu detekciju porasta mikobakterija i savremenim molekularnim metodama. Molekularne metode su zasnovane na umnožavanju nukleinskih kiselina i koriste se za direktnu detekciju bacila tuberkuloze i brzu identifikaciju izolovane kulture mikobakterija. Takođe je skraćeno vreme testiranja osetljivosti bacila direktnim utvrđivanjem prisustva rezistentnih bacila u uzorku bez kultivisanja, ili brzim ispitivanjem osetljivosti prethodno izolovanih kultura tuberkuloze. Komercijalni testovi su koncipirani tako da se za kratko vreme utvrdi prisustvo multi-rezistentne tuberkuloze. Cena ovih testova je i dalje visoka za naše uslove, te se ne koriste široko, nego postoje jasne indikacije za njihovo korišćenje.

Ključne reči: tuberkuloza, molekularne metode, tečne podloge, PCR, test osetljivosti.

SUMMARY

It is an increasing rate of resistant tuberculosis, above all, that has influenced development of rapid laboratory diagnostic methods. Earlier detection of sensitivity or resistance to antituberculous drugs enables earlier initiation of the appropriate treatment. Shortening of bacteriological diagnosis of tuberculosis was achieved after introduction of liquid cultures with different sensitive systems for the early detection of mycobacterial growth and modern rapid molecular testing. Molecular methods based on nucleic acid amplification are used for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* as well as rapid identification of mycobacterial culture. Moreover, the time of resistance testing is significantly shortened by direct detection without cultivation and by much faster drug-susceptibility testing in previously cultivated acid-fast bacilli. Now we have commercial tests for fast detection of multi-drug resistant tuberculosis. However, their availability in our conditions is limited by their costs, and they are not widely used. Still, clear indications for their application are accepted.

Keywords: tuberculosis, rapid molecular testing, liquid culture system, PCR, drug-susceptibility testing.

Uvod

Iako je Svetska Zdravstvena Organizacija još krajem prošlog veka započela sa programima kontrole tuberkuloze i najavila njenu eradikaciju, i dalje je jedna trećina čovečanstva inficirana ovim bacilom. Sve više zabrinjava rastući problem rezistencije uprkos dostupnosti odgovarajućih lekova za uspešno lečenje tuberkuloze. Za ovaj fenomen su odgovorni kako adaptibilnost samog bacila, tako i nezaobilazan ljudski faktor. Imajući u vidu da je brza i tačna mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze jedan od osnova programa kontrole ove bolesti, jasno je da uvođenje novih i brzih laboratorijskih testova ima veliki značaj. Tokom nekoliko poslednjih decenija došlo je do znatnog pomaka u oblasti laboratorijske medicine, tako da je razvijen i veliki broj tehnika za brzu mikobakteriološku dijagnostiku (1).

Standardne metode u dijagnostici tuberkuloze

Konvencionalne mikrobiološke metode podrazumevaju mikroskopsko dokazivanje acidorezistentnih bacila bojenjem po Ziehl-Neelsenu i kultivaciju na Löwenstein Jensen podlozi. Direktna mikroskopija je brza dijagnostička metoda niske senzitivnosti (45-80%) i specifičnosti, sa obzirom da je za detekciju potrebno prisustvo više od 5000 acidorezistentnih bacila po cm³, te da se na ovaj način se ne mogu razlikovati *M. tuberculosis* od atipičnih mikobakterija i drugih acidorezistentnih bacila. Ova metoda je i dalje vrlo korisna u svakodnevnom radu, pošto izdvaja one bolesnike koji su zarazni i koje je potrebno odmah izolovati i uputiti u specijalističke pulmološke ustanove radi brzog započinjanja lečenja. Kultivacija traje 3–8 nedelja, ali kako je za detekciju dovoljno 10–100 bacila u uzorku, radi se o visoko senzitivnoj metodi koja je i danas zlatan standard u dijagnostici tuberkuloze. Na ovaj način se vrlo precizno može utvrditi da postoji rast kulture, potom izvršiti identifikacija bacila i uraditi test osetljivosti na antituberkulotike. Za ovaj postupak je često potrebno da prođe i tri meseca. Na žalost, to je veoma dug period tokom kojeg se bolest može razbuktati zbog korišćenja neadekvatnih lekova (na koje je bacil rezistentan), a bolesnik sve vreme može biti zarazan za svoju okolinu. Iz tog razloga se radilo na otkrivanju novih metoda koje će biti dovoljno senzitivne i specifične, a koje će skratiti period potreban za dobijanje rezultata identifikacije uzročnika, kao i njegove osetljivosti na lekove (2,3).

Brze metode bakteriološke dijagnostike tuberkuloze

Skraćivanje mikobakteriološke dijagnostike tuberkuloze može da se izvede na dva načina:

- kultivisanjem u tečnim podlogama u različitim osetljivim sistemima za ranu detekciju porasta mikobakterija, a zatim brzom identifikacijom izolovane kulture

- primenom molekularnih tehnika
- ### Izolovanje mikobakterija u tečnim podlogama

Vreme potrebno za rast vidljivih kolonija spororastućih mikobakterija je glavni nedostatak kultivisanja na čvrstim podlogama. Savremeni standardi bakteriološke dijagnostike tuberkuloze u Evropi nalažu da se bacil izoluje u roku od 21 dana, a da se u toku narednih 24 do 48 sati izvrši i njegova identifikacija. U Srbiji je tokom poslednjih 8 godina sprovođenja Projekta kontrole tuberkuloze značajno uređena i osavremenjena mikobakteriološka dijagnostika tuberkuloze. Svaka ustanova je u skladu sa svojim mogućnostima obnovila laboratorijsku opremu. Tako se u Institutu za plućne bolesti Vojvodine kultivacija bacila na tečnim podlogama radi od 2003. godine kada je kupljen BacT/Alert.

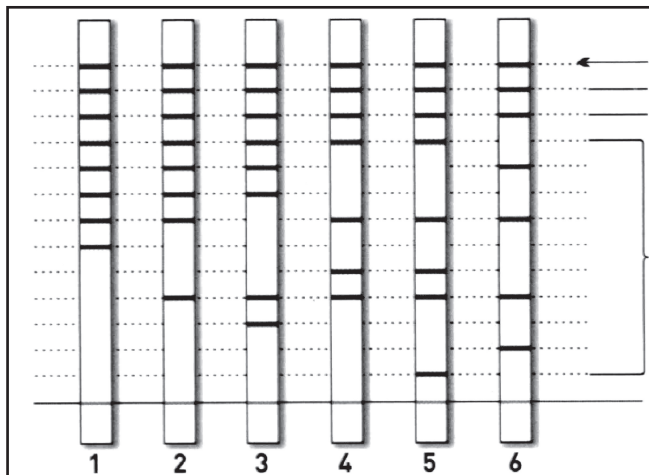
Uvođenjem BACTEC radiometrijskog sistema 80-ih godina prošlog veka načinjen je veliki pomak u dijagnostici tuberkuloze. Rana detekcija mikobakterija u ovom sistemu se zasniva na metabolizmu bacila, a ne na njegovom vidljivom rastu. Tokom procesa rasta bakterija vrši se merenje radioaktivnosti koja je direktno srazmerna količini CO₂ proizvedenog tokom metabolizma mikobakterija. Da bi se izbegla primena radioaktivno obeleženog supstrata, razvijeni su neradiometrijski sistemi, kao što su MB/Bact, BACTEC 9000 i MGIT. U njima se količina CO₂ meri fotometrijski, a ne radiometrijski. U ovakve radiometrijske sisteme spadaju i BacT/Alert koji se koristi u našem Institutu. Kada se radi sa ovim sistemima, vreme potrebno za izolaciju i identifikaciju mikobakterija, kao i test osetljivosti se skraćuje na 3 do 4 nedelje (4, 5).

Molekularne tehnike

Molekularne metode za detekciju *M. tuberculosis* koje su zasnovane na umnožavanju nukleinskih kiselina su u bakteriološku dijagnostiku uvedene pred kraj prošlog veka. One predstavljaju brze, visoko specifične i senzitivne metode identifikacije uzročnika tuberkuloze. Ovi testovi se mogu raditi na već izolovanoj kulturi, a mogu se primeniti i na uzorcima bez prethodnog kultivisanja, odnosno iz direktnog preparata (6).

Ono što je važno zapamtiti pri odabiru odgovarajućeg testa je da ni u kom slučaju ne treba koristiti nestandardizovane metode. Osnovni i suštinski nedostaci ovih nestandardizovanih metoda su nedovoljna senzitivnost, specifičnost i reproducibilnost, i u tom smislu se ne preporučuje njihova primena (6). Za rutinsku dijagnostiku su razvijeni standardizovani komercijalni testovi - AccuProbe assay (Gen-Probe), INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics) i GenoType® Mycobacterium (Hain Lifescience). Svi ovi testovi obezbeđuju visoko specifičnu i senzitivnu identifikaciju mikobakterija za svega nekoliko sati i što je veoma značajno – reproducibilni su (7,8).

U Srbiji se ovi testovi za sada rade samo u Nacionalnoj referentnoj mikobakteriološkoj laboratoriji u KCS u Beogradu. U NRL se koriste GenoType® Mycobacterium testovi (proizvođač Hain Lifescience) čija je senzitivnost 100% a specifičnost između 97 i 100% (4).



Slika 1. Smernice za tumačenje rezultata GenoType® Mycobacterium testa 1- *M. tuberculosis*; 2 – *M. africanum*; 3 – *M. microti*; 4 – *M. bovis ssp. bovis*; 5 – *M. bovis* BCG; 6 – *M. bovis ssp. caprae* (preuzeto iz Vodiča za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze Ministarstva zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2009.)

Prva faza u izvođenju ovih testova je izolacija DNK (ćelijski zid se razbija delovanjem visoke temperature i ultrazvuka). Sledeća faza je amplifikacija specifičnih sekveneci DNK pomoću PCR (polymerase chain reaction), nakon čega se vrši (reverzna) hibridizacija obeleženih PCR produkata sa odgovarajućim probama (4).

Time se dobijaju rezultati u vidu tamnih linija na mestima gde je došlo do reakcije hibridizacije, a nakon toga sledi interpretacija rezultata poređenjem sa smernicama datim od strane proizvođača (slika 1).

Brze tehnike u ispitivanju osetljivosti bacila tuberkuloze na antituberkulotike

Konvencionalno testiranje rezistencije se zasniva na metodama koje procenjuju porast mikobakterija u prisustvu antituberkulotika. Najčešće se koristi metod proporcije na Löwenstein-Jensen podlozi koji traje nekoliko nedelja. Primenom savremenih mikobakterioloških dijagnostičkih procedura, i to direktnim utvrđivanjem, odnosno isključivanjem prisustva rezistentnih bacila u uzorku bez kultivisanja, ili brzim ispitivanjem osetljivosti prethodno izolovanih kultura bacila tuberkuloze, ovaj process se može značajno skratiti (4).

Prvo značajnije skraćenje testa rezistencije je postignuto uvođenjem BACTEC 460 TB sistema čiju je širu primenu ograničila činjenica se radi o radiometrijskoj metodi. Neradiometrijski sistemi (MGIT960) su preuzeli primat i u ovom delu mikobakteriološke dijagnostike. Prosečno vre-

me izvođenja testa rezistencije na neradiometrijskom sistemu je 8 do 10 dana (4, 8, 9).

Danas postoji veliki broj molekularnih tehnika koje omogućavaju brzo utvrđivanje rezistencije bacila tuberkuloze. Najvažniji zajednički princip genotipskih testova je detekcija mutacija odgovornih za pojavu rezistencije na dati antituberkulotik. Otkrivanje svih mutacija još uvek nije dostupno u rutinskoj dijagnostici. Iz tog razloga se ovim testovima detektuju samo one mutacije za koje je dokazano da su najčešće prisutne i najznačajnije za nastanak rezistencije na određeni antituberkulotik. Genotipski testovi za ispitivanje rezistencije se mogu koristiti direktno u uzorku, kao i u prethodno izolovanoj kulturi mikobakterija. Ovim testovima se obavezno ispituje rezistencija na rifampicin koja je ključna, jer se smatra markerom multiple rezistencije. Takođe, pojedini od ovih testova otkrivaju i rezistenciju na izonijazid. Na taj način su komercijalni testovi koncipirani tako da se za kratko vreme utvrdi prisustvo multi-rezistentne tuberkuloze (8, 4).

GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience) koji se koristi u NRL je molekularni genetički test koji omogućava simultanu identifikaciju *M. tuberculosis* kompleksa i detekciju rezistencije na rifampicin i izonijazid. Test se može uspešno koristiti i direktno u mikroskopski pozitivnim uzorcima sputuma i u već izolovanim kulturama bacila. U oba slučaja testom se identifikuje *M. tuberculosis* i utvrđuje osetljivost na rifampicin i izonijazid. Zbog svega toga, ovaj test pruža dragocenu mogućnost brzog i efikasnog otkrivanja multirezistentne tuberkuloze (4, 8, 10, 11).

Zaključak

Savremene bakteriološke dijagnostičke procedure za detekciju *M. tuberculosis*, njegovu identifikaciju i utvrđivanje osetljivosti na dva najvažnija antituberkulotika (rifampicin i izonijazid) su dovele do značajnog pozitivnog pomaka u kontroli tuberkuloze. Pomoću njih za puno kraće vreme nego ranije možemo postaviti dijagnozu i započeti odgovarajuće lečenje, a što je još važnije, možemo brzo postaviti dijagnozu MDR TB.

U bogatim zemljama Evrope čak 90% bakteriološke dijagnostike tuberkuloze se bazira na ovim metodama. U Srbiji to nije i ne treba da bude slučaj. Kod nas je ove metode potrebno koristiti ciljano i racionalno.

Tečne podloge postoje u svega nekoliko mikobakterioloških laboratorija u Srbiji (tačnije 5), od kojih su dve u Vojvodini (IPBV i Specijalna bolnica u Zrenjaninu). Prema savremenim standardima trebalo bi za svaki uzorak zasejati jednu tečnu i jednu čvrstu podlogu. Međutim, ono što je realno u našoj situaciji je da se na tečnu podlogu zasejavaju:

- mikroskopski pozitivni uzorci
- uzorci za dijagnostiku vanplućne TB
- sumnja na rezistentnu TB.

Molekularne tehnike predstavljaju još uvek nedostižnu vrstu dijagnostike za većinu naših mikobakterioloških laboratorija. Postoje, međutim, situacije u kojima je neophodno brzo utvrditi postojanje rezistencije na rifampicin i izonijazid, odnosno brzo dijagnostikovati MDR TB. Postojanje ove dijagnostike u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji omogućuje svim centrima za dijagnostiku i lečenje tuberkuloze u Srbiji da ovu mogućnost koriste i to u sledećim slučajevima:

- prethodno lečeni bolesnici
- suspekti iz pregleda kontakta sa MDR-TB
- kultura monorezistentna na rifampicin ili izoniazid
- potvrda MDR-TB
- pozitivne kulture posle 3 meseca lečenja
- uzorci iz bolnice u Beloj Crkvi

Pravilnim korišćenjem svih bakterioloških dijagnostičkih procedura u mogućnosti smo da na vreme i tačno postavimo dijagnozu tuberkuloze i sprovedemo odgovarajuće lečenje a sve u cilju što većeg uspeha lečenja i još bolje kontrole ove bolesti.

Literatura

1. Smernice za programsko lečenje tuberkuloze rezistentne na lekove, Beograd, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, 2007, 1-149.
2. Meya DB, McAdam KPWJ et al. The TB pandemic: an old problem seeking new solution. *J Internal Medicine* 2007; 261: 309–29.
3. Vukelić A. Metode u bakteriološkoj dijagnostici tuberkuloze. U: Ljuština-Pribić R, Petrović S (Edts), Tuberkuloza u dečjem uzrastu, Novi Sad, 2007, 59-65.
4. Savić B, Vuković D, Stefanović G, Tomić Lj, Dakić I. Vodič za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze, Beograd, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, 2009, 60-68.
5. Williams-Bouzer N et al. Comparison of the BACTEC MIGHT 960 ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4167-70.
6. Lepšanović Z, Savić D, Tomanović B. Pouzdanost primene Cobas Amplicor PCR testa za detekciju *Mycobacterium tuberculosis* iz respiratornih i ne-respiratornih uzoraka. *Vojnosanitetski pregled*, Beograd, 2009; 66 (12): 922-997.
7. Goessens WHF, Man P, de Koeleman JG, Luijendijk A. et al. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (6): 2563-56.
8. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): Policy Statement. WHO Report, Geneva, Switzerland, 2008, 3-10.
9. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary report of the Expert Group Meeting on the use of liquid culture media, WHO Report, Geneva, Switzerland, 2007, 2-8.
10. Ling DI et al. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal* 2008; 32 (5): 1165–1174.
11. Obrovac M, Katalinić-Janković V, Grce M. Određivanje otpornosti vrste *Mycobacterium tuberculosis* na Isoniazid multipleks PCR metodom. *Medicina* 2007; 43: 47-54.

PRIMENA IGRA TESTOVA U DIJAGNOSTICI TUBERKULOZNE INFEKCIJE

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS IN DIAGNOSING TB INFECTIONS

Kašiković Lečić Svetlana, Kukavica Darinka, Kurucin Tatjana, Trudić Anika, Orlović Jelka

Korespondencija:

Doc. dr Svetlana Kašiković Lečić

KLINIKA ZA TUBERKULOZU I GRANULOMATOZNE BOLESTI PLUĆA

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:32-37

SAŽETAK

IGRA testovi (IGRA assays - interferon gamma release assays) su novi testovi za utvrđivanje prisustva tuberkulozne infekcije (prvenstveno latentne) kod ispitanika. Zasnovani su na konceptu da T ćelije osoba senzibilisanih M. tuberculosis oslobađaju interferon gama (IFN- γ) pri ponovnom susretu sa mikobakterijskim antigenima. Zbog toga se IGRA testovi nazivaju i IFN- γ testovi. Mada su rane verzije IGRA testova koristile prečišćeni proteinski derivat (PPD) kao stimulirajući antigen, novije verzije koriste antigene koji su specifični za M. tuberculosis.

U protekloj deceniji na tržištu su se pojavila dva IGRA testa: Quantiferonski test i T-SPOT.TB test. Quantiferonski test se zasniva na primeni ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) metode i određivanju koncentracije interferona gama u krvi ispitanika. T-SPOT.TB test primenom ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot) tehnike određuje broj T limfocita koji proizvode IFN- γ u susretu sa antigenima specifičnim za M. tuberculosis. Kao i tuberkulinski kožni test i IGRA testovi imaju svoje prednosti i mane.

Danas se IGRA testovi upotrebljavaju u mnogim, uglavnom razvijenim zemljama sveta. U nekim od njih ovi testovi su zamenili dosadašnji, tradicionalni tuberkulinski kožni test, dok se u drugim zemljama pored PPD testa primenjuju i IGRA testovi radi potvrde pozitivnosti PPD testa. U Republici Srbiji je do sada registrovan samo Quantiferonski test. U Institutu za plućne bolesti Vojvodine ovaj test je do sada korišćen samo u naučnoistraživačke svrhe.

Potrebna su dalja ispitivanja IGRA testova u cilju utvrđivanja korisnosti njihove primene u svakodnevnom kliničkom radu.

Ključne reči: tuberkuloza, IGRA, Quantiferon, T-SPOT.TB.

SUMMARY

Interferon gamma release assays (IGRAs) are the novel tests for detecting TB infections, primarily the latent ones. They are based on the concept that the T cells of M. tuberculosis sensitized subjects release interferon gamma (IFN- γ) at a repeated contact with mycobacterial antigens, therefore also termed the IFN- γ -tests. Although the early IGRA versions used a purified protein derivative (PPD) as a stimulating antigen, the recent versions use M.tuberculosis-specific antigens.

Two IGRA versions have emerged in the last decade: the Quantiferon and the T-SPOT.TB test. The Quantiferon test is based on applying the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), and measuring interferon gamma concentrations in the patients' blood. The T-SPOT.TB test applies the Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) technique to determine the count of IFN- γ -releasing lymphocytes in contact with M.tuberculosis-specific antigens. Like tuberculin skin tests, IGRAs also have their pros and cons.

IGRA tests are nowadays applied in many, mostly developed countries, somewhere entirely substituting the traditional tuberculin skin test, or accompanying the PPD test to confirm its positivity. In the Republic of Serbia, only the Quantiferon test has been officially registered so far. It has been applied in the Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina for scientific research only.

IGRAs require further investigation to evaluate their utility in the routine clinical practice.

Key words: tuberculosis, IGRA, Quantiferon, T-SPOT.TB

Uvod

Broj obolelih od tuberkuloze u svetu stalno raste. Godišnje se prijavi šest do osam miliona novih aktivnih slučajeva tuberkuloze. Ocenjeno je da širom sveta od tuberkuloze svakog minuta umre četiri čoveka, a godišnje oko dva miliona ljudi (1). Kao najčešći uzroci porasta morbiditeta od tuberkuloze navode se: epidemija infekcije virusom humane imunodeficiencije (HIV), migracija stanovništva, porast siromaštva i porast broja obolelih koji su inficirani rezistentnim sojevima mikobakterija i koji su neizlečivi, jer antituberkulotici nemaju efekta (1). Ukoliko celokupna zajednica ne preduzme odgovarajuće korake svetu preči epidemija neizlečive tuberkuloze, uzrokovane multirezistentnim uzročnikom, što nas vraća u eru pre otkrića efikasnih lekova, antituberkulotika - kada je svaka peta osoba u Evropi umirala od tuberkuloze (19. vek) (1).

Uzimajući u obzir navedene činjenice Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO) je 1993. godine proglasila tuberkulozu globalnim zdravstvenim problemom i opštom opasnošću po svet (1). Pojačani su naponi SZO na stvaranju novih vodiča za rano otkrivanje, izolaciju i lečenje obolelih od tuberkuloze (DOTS). Dodatni deo opšte STOP-TB strategije koja je pokrenuta 2006.g. usmeren je na razvoj boljih lekova, razvoj nove vakcine i poboljšanje dijagnostike (1).

Prema najnovijim stavovima SZO pored ranog otkrivanja, izolacije i lečenja obolelih, neophodno je usmeriti napore ka pronalaženju i tretmanu osoba sa latentnom tuberkuloznom infekcijom (LTBI). Ako je dijagnostikovana, LTBI može da se leči i time spreči progresija u ATB. Hemioprofilaksa (preventivna terapija ATB) podrazumeva preventivno davanje antituberkulotskih lekova osobama sa značajnim rizikom od razvoja ATB, tj. lečenje latentne tuberkulozne infekcije (LTBI) radi smanjenja rizika od progresije ka klinički manifestnoj bolesti (ATB), kao i davanje lekova osobama koje su pod povećanim rizikom da dobiju ATBI, a nisu inficirane (1).

Osobe sa značajnim rizikom od progresije infekcije u bolest (ATB) predstavljaju (2): osobe sa imunokompromitovanim stanjima (urođena i stečena: dugotrajna primena glikokortikoida (>15 mg dnevno prednizona ili analoga duže od 4 nedelje), polihemioterapije, anti-TNF- α tretmana i dr. imunosupresivne terapije, koinfekcija HIV virusom, maligne bolesti (hematološki maligniteti: leukemije, limfomi, karcinomi glave, vrata i pluća), transplantacija organa, dijabetes melitus, terminalni stadijum hronične bubrežne slabosti, gasterektomija, jejuno-ilealni bajpas, silikoza, al-

koholizam, intravenska narkomanija, pušenje, pothranjenost veća od 5% i dr.), deca do 5. godine života, osobe sa svežom konverzijom tuberkulinskog kožnog testa (prema preporukama Centa za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC): ako je PPD test veći za ≥ 10 mm od prethodnog, izvršenog tokom poslednje dve godine).

Hemioprofilaksa se u našoj zemlji sprovodi primenom izonijazida u trajanju od 6 meseci (6H) ili kombinacijom izonijazida i rifampicina u trajanju od 3 meseca (3HR). Kod HIV pozitivnih lica ili osoba koje imaju druga stanja imunosupresije hemioprofilaksa se sprovodi izonijazidom u trajanju od 12 meseci (2). Od nedavno se umesto termina "preventivna terapija" ili "hemioprofilaksa" koristi izraz "tretman LTBI" (2).

Poznato je da latentna infekcija *M. tuberculosis* indukuje jak ćelijski imunski odgovor posredovan CD4⁺ ćelijama Th1 tipa, tako da njegovo određivanje može da posluži kao senzitivn pokazatelj prisustva malog broja uspavanih bacila.

Tuberkulinski kožni test (PPD test) je više od 100 godina bio jedina skrining metoda za identifikaciju osoba sa tuberkuloznom infekcijom (3). Međutim, primenom PPD testa bilo je nemoguće da se identifikuje latentna infekcija *M. tuberculosis* među BCG vakcinisanim osobama i da se izdvoje oni koji su pod rizikom od razvoja aktivne tuberkuloze. To je zbog toga što ovaj test koristi PPD (prečišćeni proteinski derivat) tuberkulin koji je mešavina mnogo antigena. On sadrži solubilne proteine ubijenih bacila tuberkuloze (*M. tuberculosis*), tj. one antigene koji se mogu identifikovati kako kod *M. tuberculosis*, tako i kod većine netuberkuloznih mikobakterija iz okruženja i kod *Mycobacterium bovis* (BCG vakcina sadrži živi atenuisani soj *Mycobacterium bovis*). Korišćenjem imunoelektroforetskih tehnika i analizom genoma mikobakterija utvrđeno je da je ukrštena reaktivnost posledica antigenske sličnosti između proteina stvorenih u različitim vrstama mikobakterija.

Od otkrića uzročnika tuberkuloze čine se pokušaji da se ekstrahuju čisti imunodominantni antigeni *M. tuberculosis* iz kulture bacila. Traganje za monospecifičnim antigenima *M. tuberculosis* koji bi bili od značaja za dijagnostiku tuberkulozne infekcije intenziviralo se prethodnih decenija. Među različitim produktima *M. tuberculosis* nedavno su identifikovana dva niskomolekularna sekretorna proteina (*Mycobacterium tuberculosis* secretory antigens-MTSA): ESAT-6 (eng.early secreted antigenic target-6) i CFP-10 (eng.culture filtrate protein-10) čiji geni pripadaju RD-1 genskom region i TB7.7 sa genima smeštenim u

RD11 genskom regionu (4,5). Oni su prisutni kod *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*), a odsutni u svim vakcinalnim sojevima (*M. bovis* *Bacillus Calmette Guerin*) i mikobakterijama iz okruženja sa izuzetkom *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. flavescens* i *M. gastrii* (4,5). Homolog ESAT-6 je identifikovan i u genomu *M. leprae*. Ovi proteini izazivaju jak T ćelijski odgovor u osoba sa tuberkuloznom infekcijom. Prema dosadašnjim rezultatima smatra se da su ovi antigeni dovoljno specifični za *M. tuberculosis* i da mogu da doprinesu poboljšanju dosadašnje dijagnostike tuberkulozne infekcije (4,5).

Imunski odgovor T ćelija domaćina na ranije unešene antigene *M. tuberculosis* može da se ispita i pomoću IGRA testova (IGRA assays - interferon gamma release assays). IGRA testovi su zasnovani na konceptu da T ćelije osoba

senzibilisanih sa *M. tuberculosis* oslobađaju interferon gama (IFN- γ) pri ponovnom susretu sa mikobakterijskim antigenima. Zbog toga se IGRA testovi nazivaju i IFN- γ testovi (6,7). Sada su komercijalno dostupna dva IGRA testa: Quantiferonski test (Cellestis, Australia) i T-SPOT.TB test (Oxford Immunotec, UK) (6,7). Prvi test se zasniva na primeni ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) metode i određivanju koncentracije interferona gama u krvi ispitanika. T-SPOT.TB test (Oxford Immunotec, UK) primenom ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot) tehnike određuje broj T limfocita koji proizvode IFN- γ u susretu sa antigenima specifičnim za *M. tuberculosis*. Za razliku od PPD testa IGRA testovi se izvode in vitro. Quantiferonski test koristi punu krv, dok T-SPOT.TB test koristi mononuklearne ćelije periferne krvi. Mada su rane verzije IGRA testovi

Tabela 1. Svojstva tuberkulinskog kožnog testa i IGRA (IFN- γ) testova

	PPD	ELISPOT	ELISA
Unutrašnje kontrole	nema	Negativna kontrola i PHA	Negativna kontrola i PHA
Antigeni	PPD	Peptidi iz CFP-10 i ESAT-6	Peptidi iz CFP-10, ESAT-6 i TB7.7
Osnova testa	koža	MČPK	Puna krv
Vreme neophodno za rezultat	48-72h	20h inkubacija i 3h za konačan rezultat	20h inkubacija i 3-4h za konačan rezultat
Ćelije u testu	Neutrofili, CD4 i CD8 ćelije pamćenja, DČ, makrofagi	CD4T-ćelije	CD4 (CD8) T ćelije u punoj krvi
Citokini u testu	IFN- γ , TNF- α , TNF- β	IFN- γ	IFN- γ
Određuje	Promer indurata	Broj efektornih T ćelija koje proizvode IFN- γ	Koncentraciju IFN- γ oslobođenog iz T ćelija pune krvi
Merna jedinica	Milimetri	Broj ćelija koje stvaraju IFN- γ	IU/ml
Rezultat merenja	Veličina induracije	Broj T ćelija koje proizvode IFN- γ	Koncentracija IFN- γ u plazmi
Efekat Th na rezultat testa	Bez efekta, ukoliko je dat ubrzo posle ekspozicije	Opada u odgovoru na terapiju, ali postoje značajne interindividualne varijacije u stopi opadanja	Opada u odgovoru na terapiju, ali postoje značajne interindividualne varijacije u stopi opadanja
Povezanost sa zaštitnom imunošću	Ne	Da	Da

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay, ELISPOT: enzyme linked immune spot; PHA: fitohemaglutinin; PPD: prečišćeni proteinski derivat; CFP: culture filtrate protein; ESAT: early secreted antigenic target; MČPK: mononuklearne ćelije periferne krvi; DČ: dendritične ćelije, IFN: interferon; TNF: faktor nekroze tumora.

va koristile prečišćeni proteinski derivat (PPD) kao stimulator antigen, novije verzije koriste antigene koji su specifični za *M. tuberculosis*: ESAT-6 i CFP-10. Treća generacija IGRA-ELISA testa (QuantiFERON-TB Gold in tube test) pored već dva spomenuta antigena koristi i TB 7.7 antigen (6). Zbog boljih tehničkih karakteristika, IGRA-ELISA test se češće upotrebljava.

Kao i tuberkulinski kožni test i IGRA testovi imaju svoje prednosti i ograničenja i nijedan od njih ne zadovoljava sve potrebne uslove (6,7). IGRA testovi su dobra alternativa PPD testu jer razlikuju BCG vakcinaciju od infekcije *M. tuberculosis* ili oportunističkim mikobakterijama. Za razliku od PPD testa, pri korišćenju IGRA testova nema grešaka oko aplikacije i očitavanja testa, niti fenomena pojačanja reakcije (ponovljeno testiranje ne dovodi do tzv. "booster fenomena"). Prednost IGRA-ELISA testa nad PPD testom je dodatak pozitivne i negativne kontrole zbog čega IGRA-ELISA test može da razlikuje prave negativne odgovore od anergije. IGRA testovi su prikladni za testiranje na velikom broju ljudi. Metodologija IGRA testova omogućuju inkubiranje uzoraka krvi na terenu i njihov jednostavan transport do laboratorija za izvođenje testa. Testiranje je brzo i jednostavno, nalaz se dobija u roku od 24 sata. IGRA testovi su prikladni za ponavljanje testiranja i za serijsko testiranje. Ponovljivost i objektivnost testa su velike.

Glavni nedostaci IGRA testova su visoki materijalni troškovi; potreba za laboratorijskom opremom za izvođenje testova i edukovanim osobljem koje treba da izvrši analizu i interpretaciju rezultata (6,7).

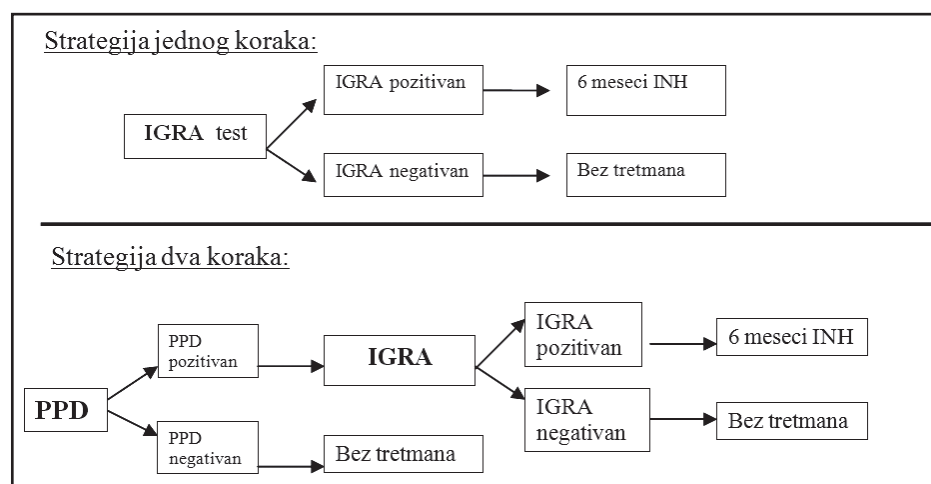
Rezultat IGRA testova može biti pozitivan, negativan i neodređen (ni pozitivan, ni negativan).

Pozitivan rezultat IGRA testa ukazuje na tuberkuloznu infekciju, ali ne pravi razliku između latentne infekcije i aktivne bolesti, niti između nedavno i ranije stečene latentne infekcije. U tom pogledu IGRA testovi su slični PPD testu. Smatra se da nema razloga da se pozitivan rezultat IGRA testa proverava PPD testom, već je u slučaju pozitivnog rezultata testa potrebno najpre da se isključi/potvrdi postojanje ATB (potrebno je sprovesti dodatnu dijagnostiku: klinički pregled, radiogram grudnog koša, bakteriološka ispitivanja: direktna mikroskopija i kulture, bronhoskopija i dr.). Ako se isključi postojanje ATB neophodna je primena hemioprolifakse kod osoba sa povećanim rizikom od razvoja ATB, a u cilju eliminacije LTBI. Ako je hemioprolifaksa kontraindikovana potrebno je praćenje inficirane osobe. Kako su ESAT-6, CFP-10 i TB7.7 antigeni odsutni kod većine poznatih netuberkuloznih mikobakterija i iz BCG vakci-

ne, moguće je da je pozitivan rezultat IGRA testa posledica infekcije *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. Ako se sumnja na takve infekcije potrebno je obaviti alternativno testiranje (6,7).

Negativan rezultat IGRA testa može da isključi infekciju *M. tuberculosis* kod imunokompetentnih osoba bez simptoma i znakova bolesti (isključivanje ATB), ali samo jedan negativan rezultat IGRA testa ne može pouzdano da isključi aktivno oboljenje kod osobe kod koje postoji sumnja da boluje od tuberkuloze. Negativan rezultat IGRA testa kod osoba koje su bile u nedavnom kontaktu sa osobama koje imaju infektivnu tuberkulozu treba da bude potvrđen ponovnim izvođenjem IGRA testa. Za sada se smatra da vreme ponovnog izvođenja IGRA testa treba da bude slično vremenu preporučenom za ponovni PPD test (8-10 nedelja od prestanka ekspozicije) (6,7).

Neodređeni rezultati IGRA testa je moguć, ali je neuobičajen. Češći je kod imunokompromitovanih osoba (posebno sa HIV infekcijom), može da bude u vezi sa starošću



(ispod 5 i iznad 80 godina života) ili je posledica odstupanja od preporučene procedure testa (tehničkih grešaka u prikupljanju krvi i izvođenju testa) (6,7).

Tokom protekle decenije IGRA testovi su intenzivno ispitivani u mnogim zemljama sveta, a sada se već primenjuju i u svakodnevnom kliničkom radu za otkrivanje tuberkulozne infekcije, prvenstveno latentne (9-11). U mnogim zemljama sveta publikovani su nacionalni vodiči za korišćenje IGRA testova, a neki tek treba da budu objavljeni. Vodiči su predominantno iz visoko razvijenih zemalja sa uspostavljenim screening programom za LTBI. Preporuke o korišćenju IGRA testova (skrining za LTBI) variraju među zemljama kao:

- Strategija jednog koraka: koristi se samo IGRA test (prvenstveno IGRA-ELISA test).
- Strategija dva koraka - prvo PPD test, pa potom IGRA test kao potvrdni test kod PPD pozitivnih osoba.
- U nekim zemljama se preporučuje primena samo jednog testa: ili PPD test ili IGRA test.

Na osnovu dosadašnjih ispitivanja stiče se utisak da je najpovoljnija strategija za korišćenje IGRA testova "testiranje u dva koraka", posebno u ispitivanjima kontakata koji su primili BCG vakcinu.

Prema preporukama Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) iz 2005.g. „IGRA-ELISA test može da se primenjuje u svim uslovima (situacijama) u kojima se koristi PPD test, uključujući i ispitivanje kontakata“ (12). Ovaj test može da se koristi umesto PPD testa ili zajedno sa PPD testom, kao pomoć pri dijagnostici LTBI i ATB. Ovaj test može da se primeni kod: dece i odraslih, kod imunokompetentnih i imunokompromitovanih osoba. Prema CDC preporukama pozitivan rezultat IGRA-ELISA testa treba da ima za posledicu iste javno zdravstvene i medicinske mere kao i pozitivan rezultat PPD testa.

Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) je juna 2010 god. objavio najnovije smernice za primenu IGRA testova u detekciji *M. tuberculosis* infekcije (13). Ove smernice jasno navode:

- situacije u kojima treba koristiti IGRA test, ali je i PPD test prihvatljiv
- situacije u kojima treba koristiti PPD test, ali je i neki od IGRA testova prihvatljiv
- situacije u kojima se ravnopravno mogu koristiti PPD test i IGRA testovi (kontakti)
- situacije u kojima treba razmotriti primenu i PPD testa i IGRA testa

IGRA-ELISA test (Quantiferonski test) je registrovan u Republici Srbiji 2009.g., ali prema našim saznanjima nije bio u upotrebi, tako da nema ni nacionalnog vodiča za njegovo korišćenje u Republici Srbiji. U Institutu za plućne bolesti Vojvodine ovaj test je do sada korišćen samo u naučnoistraživačke svrhe (14).

Zamena PPD testa IGRA testovima ili njihovo kombinovano korišćenje može biti korisnije u dijagnostici infekcije, što je od kliničkog značaja zbog smanjenja broja osoba kod kojih se indikuje sprovođenje hemioprolifakse/DOTS ili dalje praćenje inficiranih. Za sada je dobra strategija da se oba testa uvrste u dijagnostički algoritam tuberkulozne infekcije. Odluka za korišćenje jednog ili drugog testa će zavisi od: ispitivane populacije, ciljeva testiranja i materijalnih sredstava (14).

Ograničenja ispitivanja senzitivnosti i specifičnosti IGRA testova

Na osnovu publikovanih ispitivanja stiče se utisak da IGRA testovi mogu biti superiorniji od tuberkulinskog kožnog testa (PPD) u identifikaciji osoba sa latentnom tuberkuloznom infekcijom (LTBI) i rizikom od razvoja ATB jer na rezultate ovih testova ne utiče prethodna BCG vakcinacija i infekcija netuberkuloznim mikobakterijama.

Postoje mnogobrojni razlozi koji otežavaju ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti ovih testova.

Najveći problem u oceni senzitivnosti i specifičnosti IGRA testova je nedostatak zlatnog standarda za LTBI (11,16). Najčešće korišćena zamena za ocenu senzitivnosti IGRA testova kod LTBI u studijama poprečnog preseka je bila novo dijagnostikovana ATB, jer osobe sa bolešću moraju biti inficirane *M. tuberculosis*. Međutim, ovo je loša zamena zbog poznatog smanjenja u ćelijski posredovanoj imunosti (koju ovi testovi ocenjuju) kod takvih bolesnika (15). Idealan zlatni standard u studijama poprečnog preseka bi bile zdrave osobe sa znanjem da imaju tuberkuloznu infekciju. Samo oni bolesnici koji su lečeni od ATB i koji su se klinički oporavili ispunjavaju ove kriterijume (11,16).

IGRA testovi nemaju optimalnu senzitivnost i ne mogu da razlikuju ATB od LTBI, što značajno smanjuje njihovu specifičnost za ATB (6,7). IGRA testovi mogu da budu korisni u dijagnostici ATB, ali ne mogu da zamene odgovarajuću bakteriološku/patohistološku/molekularnu potvrdu bolesti. Za sada je najveća potencijalna korist IGRA testova u isključivanju dijagnoze ATB ili u dijagnostici vanplućne tuberkuloze (16-18).

Dodatno važno ograničenje u ispitivanju senzitivnosti i specifičnosti IGRA testova je heterogenost u pogledu izlaznih rezultata objavljenih ispitivanja koja su sprovedena u različitim okruženjima, često sa malim brojem ispitanika, koji su imali različite rizike za ekspoziciju i infekciju i sa različitim vremenom testiranja. Korišćenje različitih doza tuberkulina i različitih graničnih (cut-off) vrednosti za definisanje pozitivnosti tuberkulinskog kožnog testa, prema preporukama nacionalnih vodiča u različitim zemljama sveta komplikuje interpretaciju rezultata tuberkulinskog kožnog testa i otežava analizu usklađenosti (ocenu senzitivnosti i specifičnosti) rezultata PPD testa i IGRA testova (18,19). Očekivana prevalenca LTBI i prevalenca i politika BCG vakcinacije je takođe značajno varirala u publikovanim istraživanjima. Zbog ovih metodoloških razlika, zbirna ocena IGRA testova može biti utvrđena samo za rezultate senzitivnosti među bolesnicima sa ATB (kao zamena za LTBI) i specifičnost u populacijama sa niskim rizikom (19).

Do danas je većina ispitivanja IGRA testova uključila istraživače koji su razvili ove testove. Ovo je neizbežno zbog nedavnog uvođenja IGRA testova, što može da stvori dva problema. Prvo, veoma složeni testovi mogu na početku da postignu odlične rezultate u istraživačkim laboratorijama, ali izvođenje testa može biti umanjeno ukoliko ga izvode istraživači sa nedovoljno iskustva. Drugo, istraživači mogu imati sukob interesa ako su zadržali finansijski interes u testu (11,16).

ZAKLJUČAK

Korišćenje IGRA testova je aktivno polje ispitivanja. Potrebna su dalja ispitivanja IGRA testova u različitim sredinama i različitim populacijama u cilju utvrđivanja korisnosti njihove primene u svakodnevnom kliničkom radu.

Očekuje se da će buduća saznanja u identifikaciji novih *M. tuberculosis* specifičnih antigena i citokina u imunskom odgovoru na mikobakterijsku infekciju doprineti daljem unapređenju i poboljšanju dijagnostičke tačnosti (senzitivnosti i specifičnosti) trenutno dostupnih IGRA testova.

Literatura

- World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2008, Geneva, Switzerland, 1–294.
- Ćurčić R, Sagić L, Kuruc V. Smernice za pregled osoba iz kontakta sa obolelim od tuberkuloze. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2010.
- Lee E, Holzman RS. Evolution and current use of the tuberculin test. Clin Infect Dis 2002; 34: 365–70.
- Kaufmann S H E, Cole ST, Mizrahi V et al. Mycobacterium tuberculosis and the host response. JEM 2005; 20(11): 1693–7.
- Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol 2004; 51(2): 359–70.
- Cellestis Limited. QuantiFERON-TB Gold: the whole blood IFN-gamma test measuring responses to ESAT-6 & CFP-10 peptide antigens [package insert]. Carnegie, Australia: Cellestis Limited; 2007. Catalogue No. 05980201. Available from: <http://www.cellestis.com/IRM/Company/ShowPage.aspx?CPID=1247>.
- Oxford Immunotec Limited. T-Spot.TB [package insert]. Abingdon, UK: Oxford Immunotec Limited; 2009. Available from: <http://www.oxfordimmunotec.com/96-UK>.
- Kašiković Lečić S, Pavlović S, Krunić V, Ilić M. Imunološki testovi za dijagnostikovanje tuberkulozne infekcije na početku 21. veka. Srp Arh Celok Lek 2010; 138(7-8): 515–7.
- Lalvani A, Thillai M. Diagnosis of tuberculosis: principles and practice of using interferon- γ release assays (IGRAS). Breathe 2009; 5(4): 303–9.
- Pai M, Menzies D. The new IGRA and the old TST: making good use of disagreement. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 529–31.
- Mori T. Usefulness of interferon-gamma release assays for diagnosing TB infection and problems with these assays. J Infect Chemother 2009; 15: 143–55.
- Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. MMWR Recomm Rep 2005;54:1–47.
- Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection – United States. MMWR Recomm Rep 2010; 59: RR-5.
- Kašiković Lečić S. Klinički značaj interferona gama u otkrivanju tuberkulozne infekcije. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Novi Sad; 2011.
- van Zyl-Smit RN, Pai M, Peprah K et al. Within-subject variability and boosting of T cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 49–58.
- 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: 340–54.
- Lange C, Pai M, Drobniewski F and Migliori GB. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly? Eur Respir J 2009; 33:1250–3.
- Park SY, Jeon K, Um SW, Kwon OJ, Kang ES, Koh WJ. Clinical utility of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. Scand J Infect Dis 2009; 41(11-12): 818–22.
- Diel R, Loddenkemper R and Nienhaus A. Evidence-Based Comparison of Commercial Interferon-gamma Release Assays for Detecting Active TB: A Meta analysis. Chest 2010; 137: 952–68.

ULOGA IZRADE ČELIJSKIH BLOKOVA U DIJAGNOSTICI PLUĆNIH OBOLJENJA

ROLE OF CELL BLOCKS PREPARATION IN DIAGNOSTICS OF PULMONARY DISEASES

Panjковић Milana, Eri Živka, Tegeltija Dragana

Korespondencija:

Doc. dr Milana Panjković

CENTAR ZA PATOLOGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:38-42

SAŽETAK

Citologija kao dijagnostička metoda zauzima važno mesto u plućnoj patologiji, posebno u dijagnostici tumora. Citološki materijal može se dobiti različitim metodama kao eksfolijativna citologija i aspiraciona citologija. Iako je eksfolijativni citološki materijal (sputum, pleuralni izliv) uglavnom obilan, tumorske ćelije su često vrlo retke i teško se uočavaju. Citološki materijal dobijen aspiracionom metodom poput transbronhijalne punkcije tankom iglom (TBFNA), transtorakalne punkcije tankom iglom (TTFNA), iglene punkcije limfnih čvorova, i kožnih promena je, sa druge strane, često oskudan, tako da pomoćne dijagnostičke metode poput histohemijskih i imunocitohemijskih (ICC) analiza obično nije moguće izvesti.

Čelijski blokovi mogu se dobiti primenom različitih metoda, pri čemu se sitni fragmenti i / ili koncentrisani citološki uzorci fiksiraju i nakon adekvatne fiksacije stavljaju u parafinske kalupe, a potom mikrotomskim nožem seku na rezove debljine oko 2 mikrona i boje standardnim Hematoksilin-eozin, ali i drugim tehnikama bojenja (Ziehl-Neelsen, PAS, Grocott i dr.), a ukoliko je potrebno vrši se ICC i molekularna analiza.

Priprema čelijskih blokova poznata je kao pomoćna metoda u dijagnostici u okviru ne-ginekološke citologije dugi niz godina unazad, ali je nepravredno zapostavljena. Ova metoda omogućuje detaljniju analizu čelijskog aranžmana i time čini most između citologije i histologije, što olakšava dijagnostički postupak. Osim toga moguće je dobiti veći broj parafinskih rezova i izvršiti dodatne analize, koje su danas u svetlu nove klasifikacije plućnih tumora postale neophodne. Na taj način značajno se povećava dijagnostička pouzdanost, senzitivnost i specifičnost citologije kao dijagnostičke metode.

Ključne reči: Čelijski blok, Imunocitohemija, Molekularna analiza

SUMMARY

Cytology as a diagnostic tool has an important role in pulmonary pathology, especially in the diagnosis of tumors. Cytological material can be obtained by different methods as exfoliative cytology and aspiration cytology. Although, exfoliative cytological material (sputum, pleural effusion) is generally abundant, tumor cells are often very rare and hard to be found. Cytological material obtained by aspiration methods such as transbronchial fine needle aspiration (TBFNA), transthoracic fine needle aspiration (TTFNA), needle puncture of lymph nodes, and skin changes, in contrast, are often sparse, so ancillary diagnostic techniques as histochemical and immunocytochemical (ICC) analysis are often not possible to perform.

Cell blocks can be obtained by using different methods. Small fragments and / or concentrated cytology samples are fixed and after adequate fixation placed in paraffin blocks and then cut with microtome knife as cuts of about 2 microns thickness and stained with hematoxylin-eosin, and other techniques of staining (Ziehl-Neelsen, PAS, Grocott), and if necessary, ICC and molecular analysis can be performed.

Preparation of cell blocks is known as an ancillary method in the diagnosis of the non-gynecological lesions for many years, but has been unfairly neglected. This method provides more detailed analysis of cell arrangement and makes a bridge between cytology and histology and facilitates diagnostic process. In addition, it is possible to obtain more paraffin sections and perform additional analyzes that now in the light of a new classification of lung tumors become necessary. Cell block preparation can significantly increase diagnostic accuracy, sensitivity and specificity of cytology as a diagnostic tool.

Key words: Cellblock, Immunocytochemistry, Molecular analysis

Uvod

Ćelijski blok je u osnovi konglomerat sitnih tkivnih fragmenata i/ili pojedinačnih i manjih grupa izolovanih ćelija iz uzorka koji je dobijen kao suspenzija. To je citopatološki uzorak ekvivalentan mikrobiopsiji i predstavlja tačku gde se suočavaju citologija i histologija, odnosno čini most između citologije i histopatologije. Ćelijski blokovi uz klasične citološke preparate omogućavaju da se pored citomorfoloških detalja uoče i arhitektonski detalji, tako da ih možemo nazvati cito-histo- patološkim uzorcima (1, 2).

Upotreba ćelijskih blokova

Uloga ćelijskih blokova u citopatološkoj analizi je unazad nekoliko godina sve veća. Koriste se u primeni specijalnih bojenja (mucicarmine, Congo red, bojenja na mikroorganizme), analizi arhitektonike (trabekularno-sinusoidalni aranžman u hepatocelularnom karcinomu), evaluaciji invazije, komparativnoj analizi sa hirurškim materijalom (peritonealna/pelvična lavaža), kvantifikaciji nekih morfoloških parametara (mitoza), poboljšavanju uzorkovanja transbronhijalnom punkcijom tankom iglom (TBFNA) i transtorakalnom punkcijom tankom iglom (TTFNA) pomoću ispiraka igle, imunofenotipizaciji, molekularnim testovima (fluorescentna in situ hibridizacija - FISH, hromogen in situ hibridizacija - CISH, In-situ engl.-polimerasa chain reaction -PCR) i kao materijal za kasnije elektivno ispitivanje (1).

Klinički uzorci koji se mogu koristiti za dobijanje ćelijskih blokova su: tečnosti – na prvom mestu efuzije (ascites, pleuralni, perikardijalni izlivi), kao i ostale tečnosti (drenaža, ciste), materijal dobijen ispiranjem (peritonealno, pelvično, bronhijalno ispiranje), eksfolijativne-deskvamovane ćelije (cervikalna citologija, sputum), materijal dobijen četkanjem (endocervikalno, bronhijalno, četkanje bilijarnih vodova), kiretažom (endocervikalna, bronhijalna), FNA citološki materijal, ispirak igle, kao i materijal dobijen guljenjem citoloških uzoraka -razmaza koji su bojeni ili neobojeni. Ćelijski blok može se dobiti i od bilo kog drugog citološkog materijala sa mikrofragmentima (1,2).

Metode izrade ćelijskih blokova

Metoda izrade ćelijskog bloka varira u zavisnosti od tipa uzorka (sveže ili fiksirane ćelije), celularnosti uzorka, prirode ćelijske distribucije (predominantno solitarne ćelije ili mikrofragmenti/agregati), očekivanih ancilarnih testova i dostupnih resursa u laboratoriji. Postoji nekoliko metoda izrade ćelijskih blokova. Ćelijski blokovi od uzoraka sa koagulumom ili sedimentom mogu se dobiti "HistoGel" metodom, "Gelatin embedding" metodom, "Agar embedding" metodom, "Plasma-thrombin" metodom i "Collodion (Celloidin) bag" metodom. Ćelijski blokovi mogu se dobiti i kalupljenjem materijala koji je dobijen aspiracijom tankom iglom (slika 1), oljušten od citoloških razmaza, materijala dobijenog pomoću Millipore filtera, od ćelija selektivno dobijenih od citoloških razmaza, kao i

od materijala tečne citologije (engl.-*liquid-based cytology* LBC) (3, 4, 5).

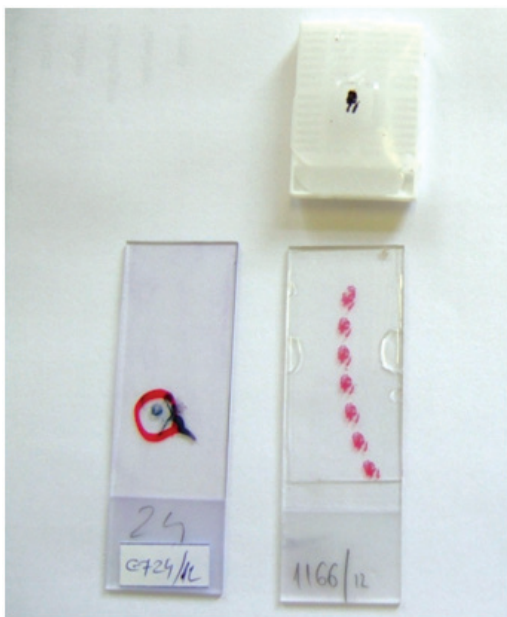
Međutim, sve ove metode se suočavaju sa zajedničkim izazovom, a to je nepredvidiv broj ćelija u rezovima dobijenim od parafinskih blokova sa retkim pojedinačnim ćelijama. Shidham i Varzegi su na primeru LBC citologije od cervikovaginalnih uzoraka koji su često manje celularnosti od uzoraka ne-ginekološkog porekla ukazali na teškoće dobijanja i upotrebe ćelijskih blokova sa malim brojem ćelija. Problem leži u tome što je teško pogoditi rezove sa najvišom koncentracijom ćelija, a time i one rezove koji će biti pogodni za histo- i imunocitohemijsku obradu. Shidham-ova metoda koja je standardizovana na LBC ginekološkoj citologiji, a može se primeniti i na ne-ginekološkoj citologiji (na uzorcima kao što su FNA, četkanje, sadržaj cista itd), može unaprediti kvalitet materijala u ćelijskim blokovima upotrebom markera (AV marker) kojim se vizualizuje područje sa najvišom koncentracijom ćelija i omogućava pravilna orijentacija rezova, što je od velike važnosti za pravilnu primenu "koordinisanog isključivanja imunoreaktivnosti", engl. "*subtractive coordinate immunoreactivity pattern* (SCIP)" pristupa (6).

Upotreba ćelijskih blokova u imunocitohemiji

Upotreba imunocitohemije (ICC) na ćelijskim blokovima značajno je unapredila mogućnosti citološke dijagnostike na svim poljima, pa tako i citološke dijagnostike plućnih lezija a naročito plućnih tumora. Iako su raniji stavovi ukazivali na nepouzdanost i nesigurnost citološke dijagnoze (7), danas citologija, posebno uz primenu ICC, zauzima ravnopravno mesto sa patohistološkim uzorcima dobijenim bronhobiopsijom ili drugim metodama (8, 9, 10, 11). Upotrebom palete antitela kao sto su: Cytokeratin 7 (CK7), Cytokeratin 5/6 (CK5/6), engl. *Thyroid transcription factor* (TTF)-1, p63, Napsin, p40, Desmocolin i drugih, moguće je razlikovanje adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma pluća (slika 2), što je od velikog značaja u svetlu nove klasifikacije tumora pluća i razvoja personalizovane medicine (12). Synaptophysin, Chromogranin, CD56 i drugi neuroendokrini markeri koriste se za dokazivanje neuroendokrinih karcinoma. Za razlikovanje primarnih i sekundarnih adenokarcinoma u plućima kod žena (porekla dojke, creva, genitalnog trakta) najčešće se koriste antitela kao sto su: TTF-1, CK7, CK20, Estrogen, Progesteron, engl. *Cancer antigen* (CA) 125, a kod muškaraca (porekla prostate, creva, želuca, bubrega) najčešće su u upotrebi TTF-1, CK7, CK20, engl. *Prostate specific antigen* (PSA), Vimentin, CD 10, engl. *Renal cell carcinoma* (RCC) i druga antitela (slika 3). Određivanje porekla skvamoznog karcinoma u plućima je znatno teže i nepouzdanost, a najčešće se koristi antitelo p16 za dokazivanje skvamoznog karcinoma porekla grlića materice (1, 2, 13).

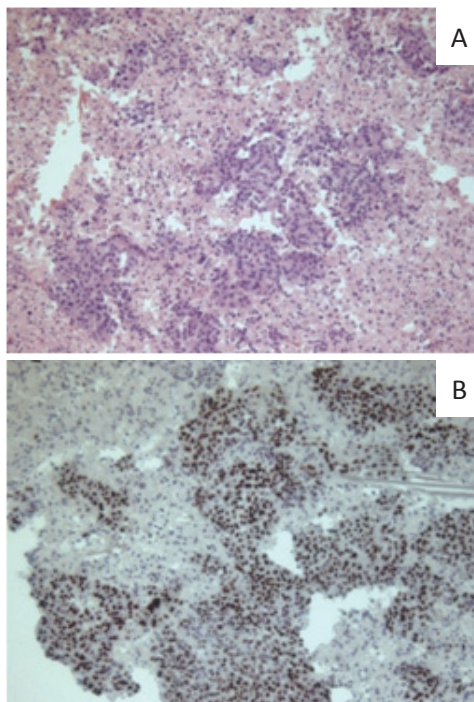
Izrada ćelijskih blokova od efuzija

Posebno mesto u izradi i primeni ćelijskih blokova imaju blokovi dobijeni od efuzija. Najvažnije pitanje koje treba razmotriti prilikom primene ICC na blokovima dobijenim od

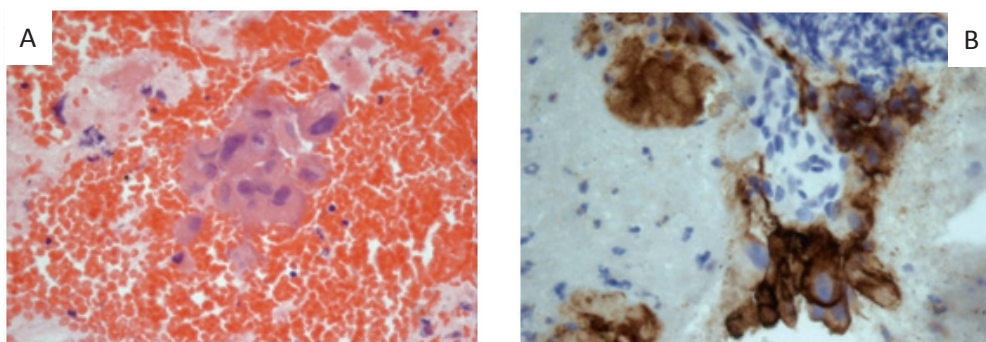


Slika 1. Čelijski blok od materijala dobijenog transtorakalnom iglenom punkcijom (TTFNA)

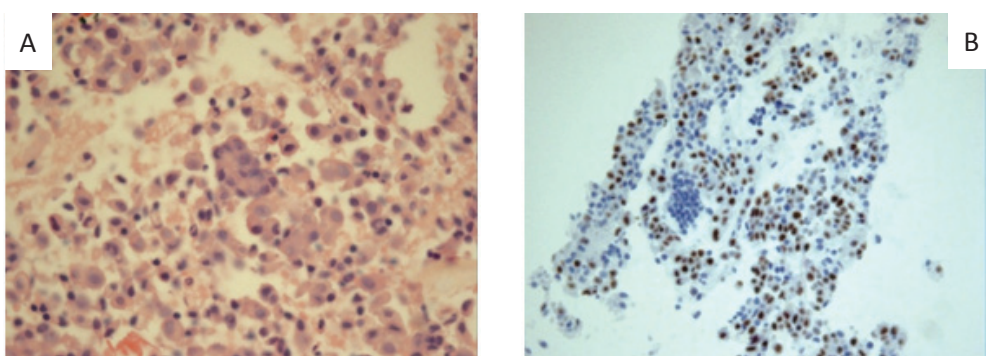
Slika 2. A. Čelijski blok dobijen transtorakalnom iglenom punkcijom (TTFNA) tumora u plućima, adenokarcinom, HEX200. B. TTF-1 pozitivnost tumorskih ćelija kod primarnog plućnog adenokarcinoma, TTF1x200.



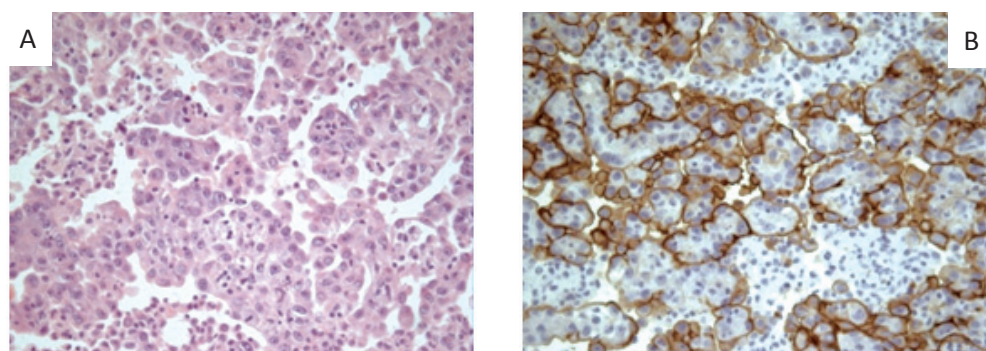
Slika 3. A. Čelijski blok dobijen ultrazvukom vođenom transbronhijalnom iglenom punkcijom (EBUS TBFNA) limfnog čvora medijastinuma na poziciji 4 desno, metastatski karcinom bubrega, HEX200. B. CD10 pozitivnost tumorskih ćelija porekla primarnog karcinoma bubrega u limfnom čvoru medijastinuma pozicije 4 desno, CD 10x 400.



Slika 4. A. Čelijski blok dobijen transtorakalnom iglenom punkcijom (TTFNA) tumora u zidu grudnog koša, maligni mezoteliom-epiteloidni tip, HEX200. B. WT1 pozitivnost tumorskih ćelija kod malignog mezotelioma, WT1x200.



Slika 5. A. Čelijski blok dobijen od materijala iz pleuralne efuzije, metastatski adenokarcinom, HEX200. B. CA 125 pozitivnost tumorskih ćelija kod metastatskog adenokarcinoma, CA125x200.



efuzija je značajna varijacija rezultata kao posledica uticaja različitih faktora od momenta uzorkovanja do same primene bojenja. Specifičnost primene ICC na ćelijskim blokovima dobijenim od efuzija leži u tome što je neophodna najpre potvrda prisustva "sekundarne-strane populacije ćelija" koje su ne-inflamatorne i ne- mezotelne prirode i koje ukazuju na postojanje metastatskog karcinoma. Teškoće i zamućenost u pronalaženju lokalizacije ovih ćelija u ćelijskim blokovima može negativno uticati na konačan rezultat, i zato je važno orijentisati serijske rezove identično na svim pločicama kao i znati iz koje dubine rezovi potiču (3, 15).

Potrebno je posebno napomenuti da ICC nema toliko značajnu ulogu u evaluaciji peritonealnih ispiraka i efuzija kao u slučaju pleuralnih izliva. Za izradu ćelijskih blokova preporučuju se oni koji su fiksirani u formalinu, dok drugi protokoli: direktni razmazi fiksirani u alkoholu ili acetonu, razmazi sušeni na vazduhu a zatim fiksirani, LBC citologija, citospin preparati i drugi nisu preporučljivi. Da bi rezultati bili reproducibilni najvažnije je postojanje standardizovanog protokola koji se može uporediti sa protokolom za histološke tkivne uzorke fiksirane u formalinu i kalupljene u parafinu (14).

Diskrepanca u rezultatima ICC između tkivnih parafinskih blokova fiksiranih u formalinu i ćelijskih blokova nije retkost. Uzroci različitih rezultata su: razlike u veličini uzorka, tip fiksativa koji se koristi, antigen-retrieval metoda, klon i titar antitela koje se koristi, razlike u protokolima i prisustvo proteinskog materijala oko ćelija koji može dovesti do nespecifične imunoreaktivnosti. Ako su rezultati dvosmisleni preporučuje se ponavljanje procedure tj. torakocenteze, jer se maligne efuzije obično brzo stvaraju. Neophodno je uzeti dovoljnu količinu materijala radi dobijanja što većeg broja ćelija. Za reproducibilnost rezultata važno je izabrati imunopanel koji će identifikovati većinu mezotelnih i inflamatornih ćelija za izdvajanje i prepoznavanje "sekundarne-strane grupe ćelija". Ova metoda nosi naziv "koordinisano isključivanje imunoreaktivnosti", engl. "*subtractive coordinate immunoreactivity pattern* (SCIP)" pristup. Dileme koje se javljaju u analizi citoloških uzoraka pleuralnih izliva i ćelijskih blokova dobijenih od njih su: razlikovanje reaktivno-hiperplastičnih mezotelnih ćelija od malignih mezotelnih ćelija (porekla malignog mezotelioma), razlikovanje malignog mezotelioma i adenokarcinoma i razlikovanje adenokarcinoma plućnog porekla od adenokarcinoma porekla drugih organa, sto nije ni malo lak zadatak. Najčešće korišćena antitela u identifikaciji mezotelnih ćelija (malignih i reaktivno-hiperplastičnih) su: Calretinin, CK5/6, HBME1, engl. *Wilms tumor gene* (WT) 1, Thrombomodulin (slika 4) i drugi, dok se u razlikovanju malignih i benignih mezotelnih ćelija najčešće koriste engl. *Embryonal membrane antigen* (EMA) i Desmin. Kao markeri za dokazivanje adenokarcinoma u upotrebi su brojna antitela kao sto su: engl. *Carcinoembryonal antigen* (CEA), TTF1, MOC31, CK20, CEA125 i druga koja upućuju na moguće poreklo tumora (slika 5) (1-3, 13, 15).

Uloga ćelijskih blokova u molekularnim analizama

Tokom poslednjih godina, usledila je u plućnoj patologiji, a naročito u dijagnostici plućnih tumora prava "revolucija malih uzoraka". Najveći broj pacijenata nalazi se u odmaklom stadijumu karcinoma pluća i vrlo često je jedini uzorak tumora dobijen bronhoskopski, a čak u 80% slučajeva dijagnoza se dobija na osnovu citološkog materijala. Praktično gledano, iz uzoraka koji postaju sve manji i manji, patolog mora da dobije i kliničaru predoči sve veći i veći broj informacija. Zato se patolozi i citopatolozi suočavaju sa velikim izazovom kako da od malog uzorka, a naročito od uzorka dobijenog tankom iglom (FNA), dobiju što više informacija i iskoriste ga na najbolji mogući način (12).

Rastući značaj personalizovane medicine doveo je do povećanja potreba i broja molekularnih analiza u tumorima pluća, koje imaju prognostički i prediktivni značaj. Najčešće analizirane mutacije su: mutacije gena za receptor epidermalnog faktora rasta- EGFR, koje upućuju na osetljivost na gefitinib i erlotinib, engl. *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*-KRAS mutacija koja je isključiva sa EGFR mutacijama i engl. *anaplastic lymphoma kinase* -ALK rearanžman koji ukazuje na osetljivost na crizotinib.

Za molekularne analize mogu se koristiti ćelijski blokovi dobijeni od FNA, fluida i drugih uzoraka, direktni razmazi i znatno ređe otisci (imprint preparati). Međutim treba imati u vidu da FNA uzorci nisu jednakog kvaliteta i da se razlikuju u zavisnosti od celularnosti i sastava lezije. Pored toga kvalitet materijala zavisi od efektivnog uzorkovanja lezije, preciznog ciljanja lezije i postproceduralnog ispiranja igle. Iako se ćelijski blokovi tradicionalno koriste za molekularne i ICC analize, oni često zbog navedenih uzroka, sadrže limitiranu količinu tkiva usled čega nastaju nepouzdati rezultati. Svaki FNA uzorak karakterišu dva parametra, a to su ukupna celularnost i čistoća tumora. Aspirat sa niskom tumorskom čistoćom može dovesti do "davljenja" mutantnog signala. Međutim, sa retkim izuzecima, ćelijski blokovi koji se od strane patologa proglašavaju kao adekvatni, sadrže dovoljnu količinu (kvantitet i kvalitet) DNA za molekularne analize (16).

Sa druge strane, direktni razmazi prema nekim autorima, predstavljaju alternativni izvor ćelija u odnosu na ćelijski blok, na kojima se takođe mogu sprovoditi ancilarne tehnike kao sto su molekularne analize (17). Dosadašnja iskustva pokazala su da je za molekularne analize potrebno najmanje 50% tumorskih ćelija za Sanger senkvencioniranje ili 25% za senzitivnije metode. Manje od 100 ćelija se smatra nedovoljnim za molekularne analize, iako se i ovi kriterijumi vremenom menjaju uvođenjem sve osetljivijih molekularnih metoda (8, 18, 19).

Iako je priprema ćelijskih blokova poznata kao pomoćna metoda u dijagnostici u okviru ne-ginekološke citologije dugi niz godina unazad, nepravedno je zapostavljena. Ova relativno jednostavna i jeftina metoda, omogućuje detaljniju analizu ćelijskog aranžmana i time čini most između citologije i histologije, što olakšava dijagnostički postupak. Osim toga ova

metoda omogućava primenu ICC i molekularnih analiza, koje su danas u svetlu nove klasifikacije plućnih tumora postale neophodne. Na taj način moguće je iz citološkog materijala dobiti neophodne prognostičke i prediktivne parametre, a značajno se povećava i dijagnostička pouzdanost, senzitivnost i specifičnost citologije kao dijagnostičke metode.

Literatura:

1. Bales CE. Laboratory Techniques. In: Koss LG and Myron RM (Edts). *Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathological Bases*, 5th ed, Lippincot Williams & Wilkins, 2006, 1570-621.
2. Naylor B and Ramzy I. Cytopathology: the past, the present and a glimpse into the new millennium. In: Gray W and McKee GT (Edts). *Diagnostic Cytopathology*, 2nd edition, London, Churchill Livingstone, 2003, 3-13.
3. Shidham VB and Eppele J. Appendix I: Collection and processing of effusion fluids for cytopathologic evaluation. In: Shidham VB and Atkinson BF (Edts). *Cytopathologic Diagnosis of Serous Fluids*, First edition, Elsevier (W. B. Saunders Company), 2007, 207-235.
4. Kaneko C, Funahashi M, Kato K, Kobayashi TK. Application of the cell block method, utilizing mount quick mounting medium. *Diagn Cytopathol* 2000; 22: 117-119.
5. Hirofumi Sakamoto, Makiyo Takenaka, Kazuki Ushimaru, Takuji Tanaka. Use of Liquid-Based Cytology (LBC) and Cell Blocks from Cell Remnants for Cytologic, Immunohistochemical, and Immunocytochemical Diagnosis of Malignancy. *Open Journal of Pathology* 2012; 2: 58-65.
6. Varsegi GM, Shidham V. Cell Block Preparation from Cytology Specimen with Predominance of Individually Scattered Cells. *J Vis Exp* 2009; 21(29). pii: 1316. doi: 10.3791/1316.
7. Christopher G. Azzoli, Sherman Baker Jr, Sarah Temin, William Pao, Timothy Aliff, Julie Brahmer et al. ASCO Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2009; Vol 27 (36): 6251-66.
8. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, Friedlander MA, Riely GJ, Travis WD et al. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol* 2011; 6(3): 451-8.
9. Nizzoli R, Tiseo M, Gelsomino F, Bartolotti M, Majori M, Ferrari L et al. Accuracy of fine needle aspiration cytology in the pathological typing of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(3): 489-93.
10. Righi L, Graziano P, Fornari A, Rossi G, Barbareschi M, Cavazza A et al. Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer* 2011; 117(15): 3416-23.
11. Sigel CS, Moreira AL, Travis WD, Zakowski MF, Thornton RH, Riely GJ, Rekhtman N. Subtyping of non-small cell lung carcinoma: a comparison of small biopsy and cytology specimens. *J Thorac Oncol* 2011; 6(11): 1849-56.
12. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y et al. International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6(2): 244-85.
13. Ganjei-Azar P, Nadjai M. *Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology*. Springer New York, 2007, 143-95.
14. Schmitt F, Cochand-Priollet B, Toetsch M, Davidson B, Bondi A, Vielh P. Immunocytochemistry EFCS inquiry Immunocytochemistry in Europe: results of the European Federation of Cytology Societies (EFCS) inquiry. *Cytopathology* 2011; 22(4): 238-242.
15. Shidham, VB and Atkinson BF. Immunocytochemistry of effusion fluids: introduction to SCIP approach (Chapter 5). In: Shidham VB and Atkinson BF. (Editors). *Cytopathologic Diagnosis of Serous Fluids* First edition, Elsevier (W. B. Saunders Company), 2007.
16. Hasanović A, Rekhtman N, Sigel CS, Moreira AL. Advances in fine needle aspiration cytology for the diagnosis of pulmonary carcinoma. *Patholog Res Int*. 2011;2011:897292. doi: 10.4061/2011/897292. Epub 2011 Jun 27.
17. Betz BL, Roh MH, Weigelin HC, Placido JB, Schmidt LA, Farnen S et al. The application of molecular diagnostic studies interrogating EGFR and KRAS mutations to stained cytologic smears of lung carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2011; 136(4): 564-71.
18. Nakajima T, Yasufuku K, Suzuki M, Hiroshima K, Kubo R, Mohammed S et al. Assessment of epidermal growth factor receptor mutation by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Chest* 2007; 132(2): 597-602.
19. Smouse JH, Cibas ES, Jänne PA, Joshi VA, Zou KH, Lindeman NI. EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer. *Cancer Cytopat* 2009; 117(1): 67-72.

ANESTEZIJA ZA DIJAGNOSTIČKE I TERAPIJSKE PROCEDURE U PULMOLOGIJI

ANESTHESIA FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PROCEDURES IN PULMOLOGY

Komarčević Milena, Spasojević Ivana, Hajduković Danica, Čikara Radmila, Plzak Gordana, Petrović Stanislava, Ćirić Aleksandra

Korespondencija:

dr Milana Komarčević

KLINIKA ZA GRUDNU HIRURGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:43-47

SAŽETAK

Tehnološki razvoj i napredak u medicinskom znanju doveli su do porasta broja dijagnostičkih i terapijskih procedura u pulmologiji koje se rade u anesteziji u prostorima van operacione sale. Mada se radiološke procedure : kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca i pozitron emisija tomografija uglavnom rade bez anestezije nekada stanje bolesnika zahteva primenu anestetika. Bronhoskopske procedure mogu se izvoditi u različitim vidovima sedacije i anestezije. Primena anestezije u prostorima van operacione sale zahteva isti stepen sigurnosti i visoke standarde. U ovom radu razmotreni su vodiči napravljeni od strane američkog udruženja anesteziologa i anestezičara i najnoviji vodič za izvođenje fiberoptičkih bronhoskopija izdat od strane britanskog udruženja koje se bavi grudnom patologijom.

Ključne reči: sedacija, analgezija, dijagnostičke procedure, bronhoskopija

ABSTRACT

Rapid advance in medical knowledge and technology today has brought more diagnostic and therapeutic procedures in pulmonary performed outside the operating suite. Although some of them like radiological procedures: computed tomography, magnetic resonance imaging, positron emission tomography do not require anesthesia, the patients condition may necessitate administration of an anesthetic. Bronchoscopic procedures can be performed with various types of sedation or general anesthesia. The anesthesia settings in a remote location must possess same level of safety and high standards. In this article we have discussed standards of delivery anesthesia in the remote location, which were established by American Society of Anesthesiologists, American Association of Nurse Anesthetist and British Thoracic Society Flexible Bronchoscopy Guideline Group.

Key words: sedation, analgesia, diagnostic procedures, bronchoscopy

Napredak u medicinskom znanju i brz tehnološki razvoj omogućili su izvođenje velikog broja sofisticiranih dijagnostičkih i terapijskih procedura van operacionih sala, od kojih se oko 40% radi u anesteziji. (1) Takav trend razvoja prisutan je i u pulmologiji gde se ove procedure najčešće izvode u radiološkim salama i bronhološkim kabinetima. Izvođenje anestezije izvan operacione sale iziskuje isti stepen sigurnosti i visokih standarda koje pruža operaciona sala, imajući u vidu familijaran odnos i brzu dostupnost anesteziološke opreme, lekova kao i dobro utreniran i obučan kadar.

DIJAGNOSTIČKE I TERAPIJSKE PROCEDURE U PULMOLOGIJI :

1. **Radiološke procedure**
2. **Bronhološke procedure** (dijagnostička bronhoskopija, endobronhijalna ultrazvučna biopsija (EBUS), laser i argon resekcije, plasiranje endobronhijalnih stentova i valvula)
3. **Hirurške dijagnostičke procedure** (medijastinoskopija i video-asistirana torakoskopija VATS)

ANESTEZIJA

Hirurški dijagnostički i terapijski postupci, medijastinoskopija i VATS-a, rade se u operacionoj sali u opšroj anesteziji. VATS se obavezno radi sa separatnom ventilacijom koja se ostvaruje plasmanom dvolumenskog tubusa. Preoperativna procena i priprema pacijenta je istovetna kao za bilo koju vrstu grudno-hirurške intervencije i zahteva obaveznu preoperativnu pripremu i anesteziološki pregled.

Radiološke procedure se kod pulmoloških bolesnika uglavnom izvode bez anestezije. Kada je bolesnik zbog postojanja metastaza u mozgu ili udruženog oboljenja centralnog nervnog sistema konfuzan, dezorjentisan, nesposoban da razume cilj procedure ili je klaustrofobičan a procedura zahteva mirno ležanje kroz duži vremenski period (kod MR) neophodno je primeniti sedaciju. Sedacija i analgezija je neophodna i u situacijama kada je procedura udružena sa bolnim, audio ili vizuelnim stimulacijama koje se smenjuju sa periodima bez stimulacije zbog čega je veoma teško prilagoditi dozu sedativa i analgetika. Zbog toga radiološki prostor mora biti opremljen aparatom za anesteziju, monitorom i svim sredstvima za CPR. Prisustvo anesteziologa je neophodno.

Bronhoskopske dijagnostičke procedure se veoma uspešno rade u površnoj (topikalnoj) anesteziji. Sedacija, analgo-sedacija ili opšta anestezija sa konvencionalnom ili visokofrekventnom JET ventilacijom mogu se primenjivati za dijagnostičke procedure ali su češće u interventnoj bronhologiji. U bronhološkim kabinetima se češće nego u operacionim salama sreću bolesnici starije starosne dobi i sa ozbiljnim pridruženim bolestima.(2)

Udruženja anesteziologa, sertifikovanih anestezičara i udruženja koja se bave radiološkim i bronhološkim procedurama u zemljama zapadne Evrope, British Thoracic Society (BTS) i Amerike (American Society of Anesthesiologists- ASA i American Association of Nurse Anesthetists-AANA), napravile su vodiče u kojima su date smernice za opremu i proceduru izvođenja anestezije.(3)

1. Standardi za primenu anestezije van operacione sale

a) Standardi za prostor i opremu:

Pored prostora u kome se rade bronhoskopske intervencije neophodan je i prostor za postanestetijski nadzor koji je opremljen odgovarajućim monitoringom (neinvasivni hemodinamski monitoring i monitoring respiratorne funkcije), opemom za kardiopulmonalnu reanimaciju (CPR), sa mogućnošću respiratorne potpore i sa dobro obučanim medicinskim kadrom.

Standardna oprema za analgo-sedacije: sto sa mogućnošću postavljanja u Trendelenburgov položaj, aparat za anesteziju, pacijent monitor, monitor pritiska za neinvazivno merenje, pulsni oksimetar, defibrilator, kompletna oprema za CPR, minimum dva izvora kiseonika, aspirator.

Dodatna oprema za opštu anesteziju: špric pumpe, vaporizeri, grejači, respiratorni monitoring, monitor telesne temperature, anestetici, analgetici, lekovi za reverziju dejstva benzodijazepina i narkotika i kardiovaskularni lekovi

b) Standardi za izvođenje anestezije

Odnose se na preproceduralnu procenu i pripremu bolesnika, postupke za vreme anestezije i postanestetijskog nadzora. Prema vodiču BTS iz juna 2013.godine ovi standardi obuhvataju sledeće postupke:

1. Kompletna preproceduralna procena bolesnika se prvenstveno odnosi na osnovno oboljenje pluća ali uključuje i procenu komorbidnog statusa koji utiče na mogućnost primene i vrstu anestezije. U proceni učestvuju ordinirajući pulmolog, bronholog i anesteziolog. Posebnu pažnju treba obratiti kod pacijenata sa astmom, hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (HOBP) i ishemijskim oboljenjem srca. Kod bolesnika sa astmom prosečan pad ekspiratornog volumena u 1. sek. (FEV1) nakon bronhoskopije iznosi oko 20% pri čemu se kod 30% pacijenata javlja pad PaO₂.(4) Prema preporuci BTS ovim pacijentima obavezno pre bronhoskopije treba aplikovati bronhodilatatore preko raspršivača.(5) Kod bolesnika sa HOBP primena bronhodilatatora pre intervencije nije obavezna, jer je nivo sedacije faktor koji utiče na intezitet i pojavu komplikacija nakon bronhoskopije.(6) U studijama u kojima je procenjivan rizik kod bolesnika sa ishemijskim oboljenjem srca za vreme bronhoskopije utvrđen je povećan broj ishemijskih EKG promena i poremećaja ritma pretežno u starosnoj grupi preko 60 godina.(7) Kod ovih bolesnika posebnu pažnju treba obratiti pri topikalnoj aplikaciji adrenalina. Bezbedna koncentracija adrenalina koji se primenjuje u cilju zaustavljanja krvarenja je 1mg (razblaženje 1: 10 000) u pojedinačnoj dozi od 3-5ml. Mada je incidenca krvarenja tokom bronhoskopije mala (mala krvarenja 0,19%, ozbiljnija krvarenja 0,29%), neophodna je preproceduralna procena rizika za njegov nastanak. Vrsta biopsije, broj trombocita, koagulacioni status, vrednosti hemoglobina i kreatinina nisu prediktivni faktori za nastanak krvarenja tokom bronhoskopije.(8) Zbog toga se ove analize rade preproceduralno jedino ako postoje klinički znaci poremećene koagulacije (BTS vodič- nivo D).(5) Prema istom vodiču bronhoskopija sa lavažom se može raditi pri vrednostima trombocita većim od 20 000/μL. Ukoliko se planira biopsija preproceduralno je neophodno dati transfuziju trombocita do vrenosti 50 000/μL. Antiagregacioni lekovi (klopidogrel) mora-

ju se obustaviti 7 dana pre bronhoskopije dok se sa promenom aspirina nastavlja sve do intencije. (Nivo preporuke C) S obzirom na nivo preporuke, rizik za nastanak krvarenja treba procenjivati za svakog pacijenta pojedinačno. U slučaju postojanja ozbiljnih pridruženih oboljenja neophodno je bolesnika dovesti u najoptimalnije stanje a hroničnu medikaciju dati i na dan intervencije.

2. Detaljno informisanje pacijenta o predstojećoj proceduri, vrsti anestezije i rizicima vezanih za njih. Obavezan je pismeni informisani pristanak na proceduru i anesteziju.
3. Pravljenje plana najsigurnije i najmanje invazivne anestezije za svakog pojedinačnog pacijenta.
4. Procena vitalnih parametara neposredno pre započinjanja anestezije
5. Rastvaranje i priprema svih lekova i obeležavanje sa tačnim imenom, koncentracijom i rokom trajanja
6. Obezbeđenje svih sigurnosnih preduslova radi smanjenja rizika od požara, električnog udara i otkazivanja opreme
7. Monitoring i dokumentovanje pacijentovog stanja tokom anestezije
8. Vođenje karte anestezije
9. Postanestetijski nadzor

VRSTE ANESTEZIJE

Tokom dijagnostičke ili terapijske procedure u zemljama gde ne postoji program edukacije neanestezijološkog kadra, kada se sprovodi bilo koji oblik anestezije ili se procedura izvodi kod pacijenta sa ozbiljnim pridruženim bolestima poželjno je prisustvo anesteziologa. Prema preporukama ASA anesteziolog sprovodi monitorisani anesteziološki nadzor (Monitored Anesthesia Care) MAC koji obuhvata učešće anesteziologa u preproceduralnoj viziti, tokom intervencije i postproceduralnom nadzoru bez obzira da li se primenjuje topikalna anestezija, analgosedacija ili opšta anestezija. Zadatak anesteziologa je da dijagnostikuje i tretira kliničke probleme u toku procedure, da vrši potporu vitalnih funkcija, daje sedative, analgetike, hipnotike, anestetike i druge lekove ali i da obezbedi psihološku potporu i komfor pacijenta. Kadar koji sprovodi MAC, ukoliko je to neophodno, mora biti sposoban da pacijenta uvede u opštu anesteziju.

Premedikacija

U premedikaciji bolesnika neposredno pre bronhoskopije koriste se različiti lekovi: antiholinergici (atropin, glikopirilat), benzodijazepini, opioidi i lekovi sa dejstvom na kardiovaskularni sistem. Antiholinergici se već dugu niz godina primenjuju u premedikaciji zbog smanjenja sekrecije,

supresije kašlja i prevencije vazo-vagalne reakcije. Tri randomizovane studije na 1300 pacijenata pokazale su da primena antiholinergika u premedikaciji nema kliničkog značaja kod pacijenata za vreme bronhoskopije. (9,10)

Prema BTS protokolu premedikacija antiholinergicima se za bronhoskopije ne sprovodi rutinski. (Nivo A)

Površinska (topikalna) anestezija

Kada se bronhoskopija radi u površinskoj anesteziji sa ili bez analgezije i sedacije, zbog mogućeg razvoja toksičnog dejstva neophodno je voditi računa o količini aplikovanog lokalnog anestetika. Najčešće se za topikalnu anesteziju koristi lidokain. Površinska anestezija se postiže primenom 2% gela nazalno (2-3ml), 10% spreja (nazalno i orofaringealno 3x 10mg) i 1-4% solucije koja se daje kroz radni kanal bronhoskopa, aplicira u traheju punkcijom krikotireoidne membrane ili preko raspršivača. Tako dat lidokain redukuje incidencu kašlja i stridora i tako smanjuje dozu sedativa. (11,12) **Toksični efekat lidokaina** klinički se manifestuje promenama u centralnom nervnom (konfuzija, svetlucanje pred očima, vrtoglavica, mioklonus, nistagmus, parestezije, konvulzije i koma sa respiratornom insuficijencijom) i kardiovaskularnom sistemu (hipotezija, bradikardija, poremećaji ritma do srčanog zastoja). Brojne su studije u kojima je procenjena optimalna doza lokalnog anestetika i u kojima je utvrđeno da se toksični efekti ne javljaju pri dozama od 7,1-9,3mg/kg. (13,14,15) Isti stepen supresije kašlja postiže se 1% i 2% lidokainom tako da je korišćenjem nižih koncentracija lidokaina (1%) bronhoskopiju moguće uraditi sa 160mg što je daleko niže od toksičnih doza. (16,17)

Sedacija i analgezija

Sedacija se za dijagnostičke bronhološke procedure sprovodi u zavisnosti od pacijentove želje, komorbidnog statusa, kadrovskih i tehnoloških mogućnosti ustanove. U toku bronhoskopije mogu je primeniti bronholog ili anesteziolog. S obzirom da sedacija predstavlja kontinuum od minimalne do veoma duboke i da nije moguće uvek predvideti individualnu reakciju pacijenta na lek, bronholog treba da daje samo doze sedativa koje izazivaju minimalnu sedaciju (anksiolizu). Prisustvo anesteziologa je poželjno za nivo lake sedacije, dok je za više nivo sedacije obavezno. Na Tabeli 1 prikazani su nivoi sedacije prema ASA. (18)

Najpogodniji lek za sedaciju je midazolam. Primenuje se intavenski u malim višekratnim dozama (1mg) do postizanja željenog nivo sedacije. Prema BTS vodiču za pacijente do 70kg maksimalna doza je 2mg, a iznad 70kg je 5mg. (5) Prednost midazolama u odnosu na druge sedative je relativno kratak poluživot i postojanje antidota (flumazenil), kojim se u slučaju predoziranja antagonizuje njegovo dejstvo. Flumazenil ima kraći poluživot od midazo-

Tabela 1: Nivoi sedacije i anestezija

	Laka sedacija (anksioliza)	Srednja sedacija (svesna sedacija)	Duboka sedacija /anal- gezija	Anestezija (opšta anestezija)
Svest	Normalno odgovara na komande, smanjena kognitivna funkcija i koordinacija	Uspavan, reaguje na verbalne komande i taktilnu stimulaciju	Uspavan, reaguje samo na ponovljene bolne stimulacije	Gubitak svesti, ne reaguje ni na ponovljene bolne draži
Disanje	Bez promena	Bez promena	Može biti neadekvatno	Asistirana ili kontrolisana ventilacija
KV sistem	Bez promena	Bez promena	Uglavnom bez promena	Može biti poremećena

KV-kardiovaskularni

lama tako da postoji mogućnost resedacije i potreba da se pacijent koji je dobio veću dozu sedativa produženo opservira. Poželjno je da deo rutinske prakse bude precizno doziranje sedativa a ne primena fumazenila. (19) Drugi lek koji se koristi za sedaciju je propofol. Zbog male terapijske širine i nepostojanja antidota može ga primeniti jedino obučeni lekar. (20) U Evropi je to anesteziolog dok u USA može biti i lekar druge specijalnosti koji je prošao propisanu edukaciju. U kombinaciji sa sedativima koriste se kratko delujući opioidni analgetici sa brzim nastupanjem dejstva (fentanil, sufentanil i remifentanil). Opioidi pored analgetskog i sedativnog efekta dovode do supresije kašlja. (16,17) Ukoliko se primenjuje kombinacija sedativ-opioid prvo se daje opioid i nakon postizanja njegovog efekta (3-5min) dodaje se sedativ. (20) Ovim načinom sedacije postiže se nivo svesne sedacije koja je najoptimalnija za izvođenje bronhoskopskih procedura. Kod pacijenata ekstremne starosne dobi i telesne mase, sa respiratornom i srčanom insuficijencijom, poremećenom funkcijom jetre i bubrega treba biti oprezan pri primeni i minimalnih doza ovih lekova.

Opšta anestezija

Opšta anestezija je lekovima izazvan gubitak svesti koji se ne može uspostaviti ni na izuzetno bolne nadražaje. Sposobnost da se održi ventilaciona funkcija je izmenjena te je uz obezbeđenje disajnog puta neophodna asistencija ili primena kontrolisane mehaničke ventilacije (posebno ukoliko se primenjuju neuromišićni relaksanti). Poremećaji kardiovaskularne funkcije su mogući. U bronhologiji se u opštoj anesteziji mogu raditi dijagnostičke bronhoskopije fleksibilnim bronhoskopom a za rigidnu bronhoskopiju i većinu interventnih bronholoških procedura opšta anestezija je neophodna. (21) Specifičnost izvođenja opšte anestezije u bronhologiji je: isto mesto delovanja bronhologa i anesteziologa (disajni put), neophodnost potpune supresije refleksa kašlja, curenje smeše kiseonika i vazduha pored bronhoskopa zbog čega se ne može na zadovoljavajući način monitorisati disajni volumen i koncentracija volatil-

nog anestetika. Primenom novih anestetika, analgetika i mišićanih relaksanata kao i veoma preciznih ventilatora za konvencionalnu ili JET ventilaciju anesteziolog je u mogućnosti da obezbedi sve uslove za kvalitetno izvođenje bronholoških procedura. Mada se savremenim konvencionalnim ventilatorima sa različitim tipovima ventilacije može obezbediti zadovoljavajuća mehanička ventilacija značajan gubitak vazduha u sistemu može kompromitovati gasnu razmenu. Zato je najoptimalniji tip ventilacije u interventnoj bronhologiji JET ventilacija. (22) Prednost ovih ventilatora je što obezbeđuju optimalan prostor za rad bronhologa uz mnogo bolju razmenu gasova i mobilizaciju sekreta nego pri konvencionalnoj ventilaciji. (23,24) Najsavremeniji tip ovih aparata „superimposed“ visokofrekventni ventilator (SHFJV) ima u sistem ventilacije inkorporiran pritskom kontrolisani tip konvencionalne ventilacije koji omogućava efikasniju eliminaciju CO₂ a samim tim i izvođenje dugotrajnih bronholoških intervencija. (25) Ovaj tip ventilatora ima modus ventilacije za laserske resekcije kojim se automatski snižava inspiratorna koncentracija O₂ na 40% i na taj način prevenira nastanak opekotina. Za bronhološke procedure može se primeniti inhalaciona ili totalna intravenska anestezija (TIVA) uz mišićnu relaksaciju. Od inhalacionih anestetika se koriste kratkododelujući anestetici, sevofluran, desfluran dok se u okviru TIVA-e primenjuje propofol. Za mišićnu relaksaciju daju se kratkododelujući nedepolarizujući relaksanti: atrakurijum, cisatrankurijum ili rokuronijum a kao analgetici fentanil, sufentanil i remifentanil. S obzirom da se svi lekovi koji se daju tokom anestezije imaju kratak poluživot a samim tim i brz prestanak dejstva, pacijenti se nakon opservacije u sobi za postanestetijski nadzor mogu vrlo brzo, bez opasnosti od resedacije, vratiti na odeljenje.

ZAKLJUČAK

Osvajanjem novih procedura u interventnoj bronhologiji povećava se broj intervencija u opštoj anesteziji. Upoznavanjem sa načinom rada pulmologa i anesteziolo-

loga i prepoznavanje eventulnih problema unapređuje se njihova saradnja što je preduslov za postizanje visokog kvaliteta rada. Kako u našoj zemlji ne postoji program edukacije lekara koji nisu anesteziolozi za primenu lekova za sedaciju, preporuka je da se sve dijagnostičke i terapijske procedure u sedaciji rade uz prisustvo anesteziologa. Preporuke koje su iznete u tekstu mogu nam biti od pomoći ali naš svakodnevni rad koji mora biti prilagođen aktuelnim uslovima i svakom pojedinačnom pacijentu.

Literatura

1. Leak JA. Hospital Basede Anesthesia Outside Operating Room. American Society of Anesthesiologist Website:http://www.asahq.org/Newletters/2003/10_03/
2. Robbertze R et al. Closed claims review of anesthesia for procedures outside the operating room. *Curr Opin Anesthesiol.* 2006; 19:436-442
3. Kotob F, Twersky RF. Anesthesia outside the operating room: general overview and monitoring standards. *Int Anesthesiol Clin* 2003; 1-15.
4. Moore WC, Evans MD, Bleecker ER, et al. Safety of investigative bronchoscopy in the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 328-336
5. Du Rand IA, Blaikley J, Booton R et al. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults. *Thorax* 2013; Vol 69:1-31
6. Stolz D, Pollak V, Chhajed PN, et al. A randomized, placebo controlled trial of bronchodilators for bronchopneumopathy in patient with COPD. *Chest* 2007;131:765-72
7. Davies RA, Mister R, Spence DP, et al. Cardiovascular consequences of fiberoptic bronchoscopy. *Eur Respir J* 1997; 10:695-698
8. Facdolongo N, Patelli M, Gasparini S. Et al. Incidence of complications in bronchoscopy. Multicentre prospective study of 20 986 bronchoscopies. *Monat Arch Chest Dis* 2009;71:8-14.
9. Malik JA, Gupta D, Aganval AN, et al. Anticholinergic premedication for fiberoptic bronchoscopy: a randomized, double blind, placebo controlled study for atropine and glycopyrrrolate. *Chest* 2009; 136:347-54
10. Cowl CT, Prakash UB, Kruger BR. The role of anticholinergics in bronchoscopy. A randomized clinical trial. *Chest* 2000; 118:88-92
11. Diaz-Fuentes G, Dalvi A, Blum S, et al. Requirement of sedation during flexible bronchoscopy among substance and nonsubstance users. *J Bronchol* 2006;13:58-60.
12. Antoniadou N, Warsnop C. Topical lidocaine through the bronchoscope reduces cough rate during bronchoscopy. *Respirology* 2009;14: 873-6.
13. Mainland PA, Kong AS, Chung DC, et al. Absorption of lidocaine during aspiration anesthesia of the airway. *J Clin Anesth.* 2001;13(6):440-6.
14. Efthimiou J, Higenbottam T, Holt D, et al. Plasma concentrations of lignocaine during fiberoptic bronchoscopy. *Thorax* 1982;37: 68-71.
15. Miliman N, Laub M, Munch EP, et al. Serum concentration of lignocaine and its metabolite monoethylglycinexylidide during fiberoptic bronchoscopy in local anesthesia. *Respir Med* 1998;92:40-3.
16. Stolz D, Kurer G, Meyer A et al. Propofol versus combined sedation in flexible bronchoscopy: a randomised non-inferiority trial. *Eur Respir J*; 2009;34:1024-30.
17. Stolz D, Chhajed PN, Leuppi J et al. Nebulized lidocaine for flexible bronchoscopy: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Chest* 2005;128:1756-60
18. Arens JF, MacLachlan AA. Billing for Offsite Anesthesia Services. American Society of Anesthesiologist Website:http://www.asahq.org/Newletters/2004/10_04/
19. Reducing risk of overdose with midazolam injection in adults. NPSA/2008/RRR011, 2008. <http://www.nrls.npsa.uk/resources/> accessed jun 2013
20. The Royal College of Anaesthetists. Implementing and ensuring safe sedation practice for healthcare procedures in adults. UK Academy of Medical Royal Colleges and their Faculties. 2001. <http://www.rcoa.ac.uk/node/2270> (accessed jun 2013)
21. Gordon N, Finlayson and Bevan G. Huges. Bronchoscopic procedures. In *Principles and Practice of Anesthesia for Thoracic surgery*. Springer Science + Business Media, LLC 2011;11:155-170
22. Hautmann H, Gammara F, Henke M, et al. High frequency jet ventilation in interventional fiberoptic bronchoscopy. *Anesth Analg.* 2000; 90:139-40
23. Brodsky JB. Bronchoscopic procedures for central airway obstruction. *J cardiothoracic Vasc Anesth.* 2003;17(5):639-46
24. Evans E, Biro P, Bedford N. Jet ventilation. Continuing Education in anesthesia, Critical Care & Pain. *Br J of Anesth* 2007;7:2-5
25. Rezaie-Majd AW, Bigenzahn DM, Denk M et al. Superimposed high-frequency jet ventilation (SHFJV) for endoscopic laryngotracheal surgery in more than 1500 patients. *Br J of Anesth* 2006; 96(5):650-9.

ENDOBRONHIJALNIM ULTRAZVUKOM NAVOĐENA TRANSBRONHIJALNA IGLENA ASPIRACIJA - NOVA TEHNIKA ZA PROCENU N STATUSA KOD KARCINOMA BRONHA

ENDOBRONCHIAL ULTRASOUND-GUIDED TRANSBRONCHIAL NEEDLE ASPIRATION - A NEW TECHNIQUE FOR EVALUATION OF N STATUS IN BRONCHOGENIC CARCINOMA

Stojanović Goran

Korespondencija:

Dr sc. med. Goran Stojanović

KLINIKA ZA PULMOLOŠKU ONKOLOGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:48-55

SAŽETAK

Kod bolesnika sa dokazanim karcinomom bronha važno je pravilno odrediti stadijum bolesti, s obzirom da se na osnovu kliničke procene stadijuma bolesti planira tretman bolesnika, određuje dalja prognoza i sudbina bolesnika. Iz tih razloga procena zahvaćenosti medijastinalnih, na prvom mestu, i hilarnih limfnih čvorova zauzima važno mesto u pretretnom periodu, kao i u toku praćenja bolesnika. Endobronhijalnim ultrazvukom navođena transbronhijalna iglena aspiracija (EBUS-TBNA) je noviji metod uzorkovanja medijastinalnog, hilarnog i interlobarnog limfnog čvora. Endobronhijalni ultrazvuk omogućava veoma precizno lokalizovanje ekstrabronhijalnih struktura i limfnih čvorova. EBUS-TBNA je postala korisna, manje invazivna tehnika u određivanju stadijuma koja nudi pristup širem krugu pozicija medijastinalnih limfnih čvorova. EBUS TBNA se smatra sigurnom metodom, komplikacije su retke. Kao metoda je korisno dijagnostičko sredstvo u određivanju stadijuma karcinoma pluća i u mnogim centrima upravo je ova metoda smanjila potrebu za hirurškom pretragom medijastinuma.

Ključne reči: endobronhijalni ultrazvuk, karcinom bronha, medijastinalni limfni čvorovi, transbronhijalna iglena aspiracija

SUMMARY

In patients with bronchogenic carcinoma, it is important to correctly determine the stage of the disease, since it is based on the clinical assessment of the disease stage, treatment plans, prognosis and further prediction and the destiny of the patient. For those reasons, assessment of mediastinal involvement is in the first place, and hilar lymph nodes has an important place in pretreatment period, as well as during follow-up. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) is a newer method for sampling of mediastinal, hilar and interlobar lymph node. Endobronchial ultrasound allows very accurate localization of extrabronchial structures and lymph nodes. EBUS-TBNA has become useful and less invasive technique in the staging which provides access to a wider range of positions of mediastinal lymph nodes. EBUS TBNA is considered a safe method, complications are rare. As a method, it is a useful diagnostic tool in the staging of lung cancer and in many centers it is this method which reduced the need for surgical examination of the mediastinum.

Key words : endobronchial ultrasound, bronchogenic cancer, metastatic lymph nodes, transbronchial needle aspiration.

UVOD

Karcinom bronha je najčešći uzrok obolevanja i umiranja od malignih tumora u svetu. Tačna dijagnoza sa histološkom ili citološkom potvrdom, kao i određivanje stadijuma bolesti je od izuzetne važnosti kod bolesnika sa karcinomom bronha jer od ova dva faktora direktno zavisi dalja terapija bolesti. Rutinski posteroanteriori (PA) i lateralni (profilni) rendgenski snimci grudnog koša predstavljaju prvu dijagnostičku proceduru, najjednostavniji i najpraktičniji su za identifikovanje bolesnika sa sumnjom na karcinom bronha. Kompjuterizovana tomografija (CT) grudnog koša se sprovodi nakon radiograma grudnog koša i znatno je senzitivnija metoda za dijagnostiku i procenu bolesti u odnosu na standardnu radiografiju. Dijagnoza se mora potvrditi citološki ili patohistološki i u tu svrhu se najčešće izvodi bronhoskopija sa uzorkovanjem tkiva. Kod bolesnika sa dokazanim karcinomom bronha važno je pravilno odrediti stadijum bolesti, s obzirom da se na osnovu kliničke procene stadijuma bolesti planira tretman bolesnika, određuje dalja prognoza i sudbina bolesnika. Iz tih razloga procena zahvaćenosti mediastinalnih, na prvom mestu, i hilarnih limfnih čvorova zauzima važno mesto u pretretmanskome periodu, kao i u toku praćenja bolesnika. Radiografske metode kao što su CT grudnog koša i pozitron emisijna tomografija (PET) pružaju detaljne informacije o veličini i metaboličkoj aktivnosti mediastinalnih čvorova, uzorci tkiva su često potrebni za preciznu procenu čvora (1-3).

Transbronhijalna iglena aspiracija-punkcija (TBNA-TBP) je osnovna bronhoskopska tehnika koja omogućuje na minimalno invazivni način uzorkovanje mediastinalnih limfnih čvorova u dijagnostikovanju limfadenopatije i određivanju stadijuma karcinoma bronha. TBP omogućava pristup širem krugu mediastinalnih i bronhopulmonalnih limfnih čvorova (pozicije 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12 i 13). Međutim, TBP je slepa procedura (bez direktne vizuelizacije limfnih čvorova) sa širokom varijabilnošću u dijagnostičkom doprinosu (30% do 80%). Mediastinoskopija je zlatni standard za stejdžing mediastinalnih limfnih čvorova kod pacijenata sa mikrocilularnim karcinomom pluća, međutim mediastinoskopija je invazivna, obavlja se u opštoj anesteziji, skupa je, zahteva dužu negu pacijenata i omogućava pristup ograničenom broju pozicija mediastinalnih limfnih čvorova (pozicije 1, 2, 3, 4 i 7). Endobronhijalno ultrazvučno vođena transbronhijalna iglena aspiracija (EBUS-TBNA) je noviji metod uzorkovanja mediastinalnog, hilarnog i interlobarnog limfnog čvora. Endobronhijalni ultrazvuk omogućava veoma precizno lokalizovanje ekstrasbronhijalnih struktura uključujući krvne sudove (korišćenjem Dopler snimanja) i limfnih čvorova. EBUS-TBNA je postala korisna, manje invazivna tehnika u određivanju stadijuma koja nudi pristup širem krugu pozicija mediastinalnih limfnih čvorova (pozicije 2, 3, 4, 7, 10 i 11). EBUS-TB-

NA kao metoda je korisno dijagnostičko sredstvo u određivanju stadijuma karcinoma pluća i u mnogim centrima upravo je ova metoda smanjila potrebu za hirurškom pretragom mediastinuma (4-7).

N status

Određivanje stadijuma bolesti je postupak u kome je osnovni kriterijum proširenost malignog oboljenja, i koji omogućava grupisanje bolesnika da bi se olakšao terapijski, prognostički i analitički pristup bolesnicima. TNM sistem (*Tumor, Nodes and Metastases*) je prvobitno ustanovio francuz *Pierre Denoix* krajem četrdesetih godina prošlog veka da bude osnova za klasifikaciju svih tumora. TNM sistem je baziran na anatomskoj proširenosti bolesti. "T" (Tumor) predstavlja status primarnog tumora, a slova ili brojevi koji mu se dodaju označavaju veličinu tumora i/ili zahvatanje susednih struktura i organa direktnim širenjem tumora. "N" (Nodus) prezentuje status regionalnih limfnih čvorova, a slovom ili brojevima je označena gradacija proširenosti njihove zahvaćenosti. "M" (Metastases) označava prisustvo udaljenih metastaza, sa slovom ili brojevima koji ukazuju na njihovo odsustvo ili prisustvo. Periodično ovaj sistem je trpeo revizije, jer su saznanja u ovoj oblasti diktirale i nužno nametale promene. Poslednja, sedma revizija, TNM klasifikacije karcinoma bronha prihvaćena je u leto 2009. godine, a njena primena je započela 01. januara 2010. U okviru N statusa nije bilo bitnih izmena u odnosu na šestu reviziju (Tabela 1).

Tabela 1. Regionalni limfni čvorovi-N status

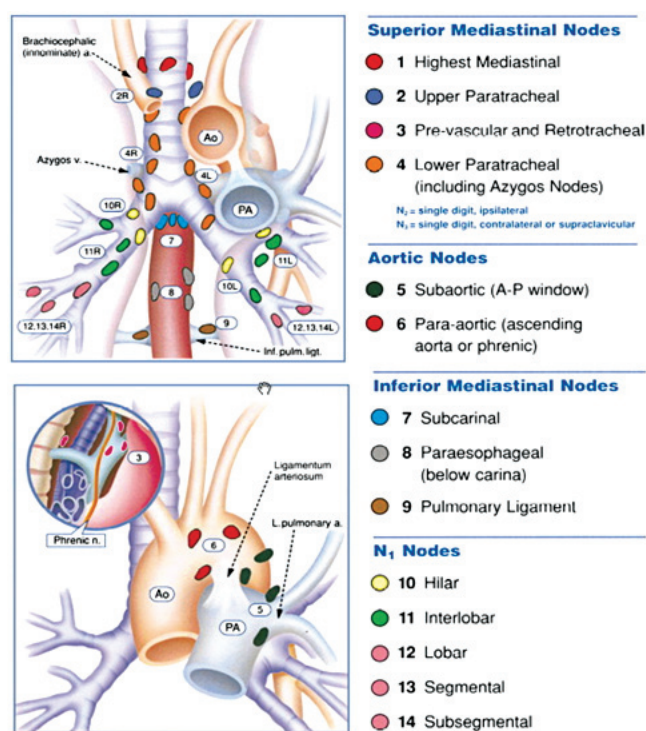
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaze bilo u ipsilateralnim peribronhijalnim ili hilarnim limfnim čvorovima, bilo i u jednim i u drugim, uključujući direktno zahvatanje
N2	Metastaze u ipsilateralnim mediastinalnim i/ili subkardinalnim limfnim čvorovima
N3	Metastaze u kontralateralnim mediastinalnim, kontralateralnim hilarnim; u ipsilateralnim i/ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima

Izvršena je podela već postojećih lokalizacija po zonama. Limfni čvorovi su mapirani prema Mount Dresler klasifikaciji (Slika 1). Evaluacija N statusa se vrši na osnovu radiološkog nalaza CT-a grudnog koša i citološkog nalaza. Kriterijum na osnovu radiološkog nalaza CT-a grudnog koša za procenu limfnog čvora da li je metastatski zahvaćen ili ne je njegova veličina, limfni čvor jednak ili veći od 10mm se smatra pozitivnim. Pri oštećenju n. recurrensa zbog kompresije uvećanih limfnih čvorova se klasifikuju kao N2, što je važno za planiranje terapije. Takođe infiltracija organa mediastinuma usled progresije limfnih čvorova (perino-

dalni rast) klasifikuje se sa N2 ili N3. Posle bilo koje dijagnostičke metode kojom je dobijena citologija limfnog čvora (punkcija, TBP, EBUS TBNA, medijastinoskopija) i ukoliko su nađene maligne ćelije smatra se da je limfni čvor pozitivan. Ukoliko nisu nađene maligne ćelije, a prisutni su elementi limfnog čvora (limfociti), nalaz je negativan, a ukoliko nema elemenata limfnog čvora isti u suštini nije ni puntkiran, te se i ne uzima u kliničko razmatranje (8-9).

Dijagnostičke metode za procenu N statusa

Tačna dijagnoza sa histološkom ili citološkom potvrdom, kao i određivanje stadijuma bolesti je od izuzetne važnosti kod bolesnika sa karcinomom bronha jer od ova dva faktora direktno zavisi dalja terapija bolesti. PA snimak grudnog koša (sa profilnim) prvi metod za postavlja-



Slika 1. Mountain Dresler mapa limfnih čvorova

nje sumnje na karcinom bronha. Veličina tumora, lokalizacija, udružena atelektaza ili pneumonitis, kontakt sa grudnim zidom, medijastinumom ili hilusom, pleuralni izlivi se mogu lako videti na ovaj način. Takođe služi i za praćenje bolesti i evaluiranje rezultata terapije. CT grudnog koša se sprovodi nakon radiograma grudnog koša i znatno je senzitivnija metoda za procenu bolesti u odnosu na standardnu radiografiju. Najviše je korišćena neinvazivna metoda za evaluaciju medijastinuma kod karcinoma bronha. Za precizniju procenu zahvaćenosti medijastinuma, vaskularnih struktura i struktura zida grudnog koša koristi se i intravenska aplikacija kontrasta. Najšire prihvaćeni kriterijum za procenu zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova je dijametar kraće ose limfnog čvora koji treba da je >1cm

na poprečnim CT skenovima. Kompjuterizovana tomografija je senzitivna ali relativno nespecifična metoda za određivanje zahvaćenosti limfnih čvorova. Razlozi su u činjenici da uvećani limfni čvorovi ne moraju biti maligno izmenjeni kao i to da normalne dimenzije limfnih čvorova ne isključuju njihovu metastatsku zahvaćenost. Često je teško pravilno proceniti CT-om infiltraciju medijastinuma naležućim centralnim tumorom. Vidljiva granica između tumora i medijastinalnih struktura nije siguran znak da medijastinum nije zahvaćen i obrnuto. Razvojem CT uređaja povećavala se i senzitivnost metode tako da se danas smatra da je CT veoma tačna neinvazivna metoda u određivanju stadijuma bolesti (stejdžingu) karcinoma bronha (2,10). Druga neinvazivna dijagnostička metoda koja se sve više koristi u određivanju stadijuma karcinoma bronha je PET-CT (*positron emission tomography-computerised tomography*), koja se zasniva na biološkoj aktivnosti neoplastičnih ćelija. Ćelije karcinoma bronha pokazuju povećano prihvatanje glukoze i višu stopu glikolize u odnosu na normalne ćelije zbog čega PET-CT koristi 18F fluoro-2-dezoksi-D glukozu (FDG) kao obeleživač. FDG se akumulira u tumorskim ćelijama koje imaju visoku iskorišćenost glukoze i mogu se zabeležiti PET kamerama. Veliki broj studija i meta analiza su pokazale da je PET superiorniji u određivanju medijastinalnog stadijuma u odnosu na CT. Implantacijom PET-a u dijagnostički algoritam za određivanje stadijuma bolesti smanjuje se broj invazivnih dijagnostičkih procedura (11).

Dijagnoza se mora potvrditi citološki ili patohistološki i u tu svrhu se najčešće izvodi bronhoskopija sa uzorkovanjem tkiva. *Bronhoskopija* je osnovna invazivna metoda u dijagnostici karcinoma bronha i predstavlja endoskopsku metodu za direktnu eksploraciju dela traheobronhijalnog stabla. Transbronhijalna iglena aspiracija-punkcija (TBNA-TBP) je bronhoskopska tehnika koja omogućuje na minimalno invazivni način određivanje medijastinalne patologije. Izuzetno je važna u određivanju medijastinalnog stejdžinga karcinoma bronha sa ukupnom osetljivošću u rasponu od 20-80%. Najviše se koristi u proceni subkarinalnih i paratrahealnih limfnih čvorova. U početku igle koje su se koristile dizajnirane su za dobijanje citološkog materijala, a kasnije razvijene su igle za dobijanje i histoloških uzoraka iz submukoznih lezija i peribronhijalnih medijastinalnih i hilarnih limfnih čvorova. Pozitivni rezultati TBNA pouzdano ukazuju na zahvaćenost limfnih čvorova tumorskim tkivom, dok negativni rezultati ne mogu isključiti zahvaćenost limfnih čvorova i potrebne su dodatne dijagnostičke metode. Osetljivost je znatno poboljšana upotrebom endobronhijalnog ultrazvuka (EBUS) (12). *Medijastinoskopija* je invazivna metoda za direktno eksplorisane medijastinalnih struktura. Ređe se koristi u dijagnostičke svrhe, kada su u pitanju promene u gornjem medijastinumu, koje nisu dostupne drugim invazivnim tehnikama. Najčešće se koristi u okviru stejdžinga karcinoma bronha i određivanju N2 odnosno N3 zahvaćenosti limfnih čvorova. Me-

dijastinoskopija je zlatni standard za histološki stejdžing kod karcinoma bronha, visoke senzitivnosti (86% do 92%) i specifičnosti (100%) što znači da nema lažno pozitivnih rezultata, ali ima i preko 10% lažno negativnih. Povezana je sa veoma niskom stopom komplikacija (0,19%) i izuzetno niskim stopom mortaliteta (0,04%). Međutim, medijastinoskopija je invazivna metoda, zahteva opštu anesteziju, hiruršku salu i hospitalizaciju pacijenta nakon intervencije. Medijastinoskopijom se može pristupiti pretrahealnim limfnim čvorovima (pozicija 1 i 3), obostrano visokim i niskim paratrahealnim limfnim čvorovima (pozicije 2 i 4 levo i desno) i subkarinalnim limfnim čvorovima (pozicija 7). Limfni čvorovi medijastinuma koji se ne mogu uzorkovati ovom metodom su pozicije 5-aortopulmonalni čvorovi, 6-paraaortalni čvorovi, 8-paraezofagealni čvorovi i 9-limfni čvorovi plućnog ligament (13,14).

Endobronhijalni ultrazvuk

Mnoga oboljenja disajnih puteva odnosno bronhijalnog zida i peribronhijalnih struktura nije bilo moguće snimiti radiološkim metodama što je zahtevalo pronalaženje nove dijagnostičke metode i sve više se osećalo da je potreban bolji modalitet snimanja za stejdžing karcinoma pluća. Prva primena endobronhijalnog ultrazvuka (EBUS)

takt obezbeđujući sliku u opsegu 360° i tačnu anatomsku orijentaciju, detaljnu analizu traheobronhijalnog zida u visokoj rezoluciji i vođeni medij premešta fokus ka periferiji tako da mogu biti vizuelizovane parabronhijalne medijastinalne strukture. Plasiranje i pozicioniranje mini sonde preko radnog kanala fiberbronhoskopa u traheobronhijalno stablo vrši se pod vizuelnom kontrolom. Kada se sonda pozicionira, balon se puni vodom dok se ne uspostavi kontakt sa zidom bronha. Dobar kontakt omogućava kompletnu cirkularnu sliku bronhijalnog zida i okolnih struktura. U cilju procene operabilnosti, detekcija, lokalizacija i strukturna analiza limfnih čvorova je jedna od indikacija radijalnog EBUS-a. Nakon lokalizacije pozicije limfnog čvora sonda se povlači kroz radni kanal fiberbronhoskopa, plasira se igla za TBP i prema prethodnoj poziciji vrši se punkcija. Na ovaj način ultrazvučnim navođenjem radijalnom sondom, prema objavljenim rezultatima više studija, postiže se uspešnost više od 80% (15,16).

Tokom 2002. godine autori su počeli da razvijaju novu konveksnu sondu EBUS-a sa ciljem da se omogući endobronhijalnim ultrazvukom navođena iglena aspiracija (*endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration*-EBUS TBNA) u realnom vremenu. Osmišljen je novi endoskop sa ugrađenom linearnom ultrazvučnom sondom na vrhu koji omogućava vođenje igle u realnom vremenu

Tabela 2 . Karakteristike radijalnog i linearnog EBUS-a

	Radijalni EBUS	Linearni EBUS
Transdutor-pretvarač	Rotacioni mehanički transdutor	Fiksni niz elektronskih transduktora usklađenih u krivolinijski šablon
Pogled	360° oko instrumenta	60° paralelno sa instrumentom
Frekvencija	20 MHz	5-12 MHz
Dubina penetracije	4-5 cm	5 cm
Kvalitet slike	Vrlo dobar. Omogućava identifikaciju slojeva zida bronha	Nije moguće identifikovati slojeve zida bronha
TBP u realnom vremenu	Nije moguće	Moguće
Dopler za identifikaciju krvnih sudova	Nije moguće	Moguće

opisana je 1990. godine. Tokom sledećih godina rešene su tehničke poteškoće i razvijale su se dijagnostičke mogućnosti i indikacije EBUS-a. Od 1999. godine EBUS se postepeno uvodi u bronhoskopsku praksu. Ovo je proširilo mogućnosti dijagnostike bronhijalne i medijastinalne patologije. Postoje dva oblika EBUS-a, radijalni i linearni (konveksni). Najznačajnije razlike prikazane su u Tabeli 2.

Prve ultrazvučne sonde su bile radijalne sonde, prečnika 3mm sa mehaničkim pretvaračem (transdutor) od 7,5 MHz na vrhu koji rotira sa 400 obrtaja i koji obezbeđuje sliku disajnog puta i okolnih struktura u obimu 360°. Kasnije su konstruisane sonde dijametra 2,5mm, sistem je bio u kompletu sa balonom i mogao se plasirati preko radnog kanala fiber bronhoskopa dijametra 2,8 mm. Balon je bio fiksiran na vrhu sonde i omogućio je kružni kon-

tokom transbronhijalne iglene punkcije- aspiracije (TBNA-TBP). Nakon prvih objavljenih preliminarnih studija, Yasufuku i sar. 2004. su pokazali efikasnost EBUS TBNA za procenu medijastinalnih i/ili hilarnih limfnih čvorova (17). Linearni EBUS koji se sada koristi u kliničkoj praksi je hibrid video fiberbronhoskopa koga karakteriše jedinstveni optički sistem koji koristi obe tehnologije i video i fiber optičku tehnologiju. Ovi instrumenti takođe koriste linearne zakrivljene transduktore koji se nalaze na vrhu instrumenta, frekvence 7,5 MHz. Skeniranje se takođe vrši paralelno u pravcu ubacivanja bronhoskopa. Obim bronhoskopa je 6,2 mm, dijametar vrha instrumenta 6,9 mm. Unutrašnji radni kanal iznosi 2mm. Pravac gledanja optičkog sistema je kosi i iznosi 35°, a polje pogleda iznosi 80°. Instrument za bolji kontakt, samim tim i bolju vizuelizaciju koristi ba-

lon ispinjen fiziološkim rastvorom. Ultrazvučna slika se obrađuje u ultrazvučnom procesoru i projekcija ovih slika zajedno sa slikom sa videobronhoskopa se prezentuje na zajedničkom monitoru. Displej režim poseduje Dopler režim sa snimanje krvnih sudova. Igle koje se koriste namenski za EBUS TBNA pričvršćuju se za radni kanal bronhoskopa i njena veličina se izražava u gajdžima (G-gauge). U upotrebi su igle od 22 G = 0,644 mm i 21 G = 0,723 mm. Igle su za jednokratnu upotrebu. Vrh igle je hiperehogeno dizajniran da poboljšava vidljivost na ultrazvuku. Ova igla ima različite podešivače koji rade kao sigurnosni uređaji i sprečavaju oštećenje kanala. Igla je dužine 40mm, opremljena je unutrašnjim žičanim vodičem koji onemogućava kontaminaciju tokom punkcije, a izvlači se iz igle nakon prolaska kroz bronhijalni zid (18).

Izvođenje EBUS TBNA

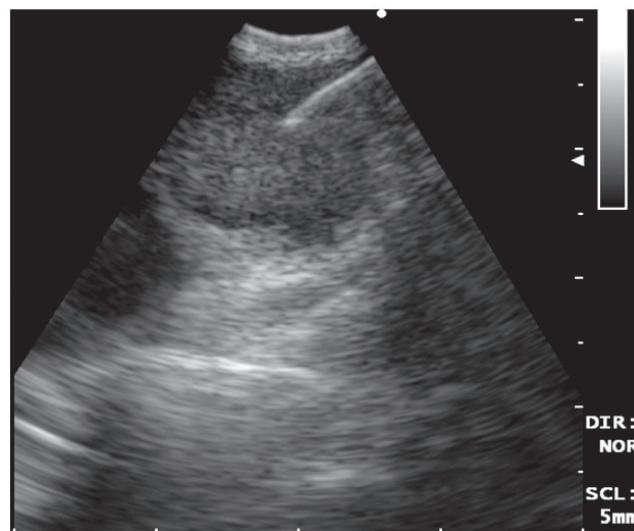
EBUS TBNA se može obavljati u analgesedaciji ili u opštoj anesteziji. Ukoliko se izvodi u opštoj anesteziji za plasiranje linearnog EBUS-a koristi se rigidni bronhoskop ili laringealna maska. Otežavajuća okolnost za bronhologa prilikom gledanja bronhijalnog stabla je optički sistem instrumenta koji je postavljen na 35° napred pod kosim uglom tako da optički sistem omogućuje gledanje u opsegu 80°. Pošto se pregled bronhijalnog stabla ne može obaviti ovim instrumentom zbog nejasne slike, prvo se uradi pregled bronhijalnog stabla konvencionalnom bronhoskopijom. Kada se uvede linearni bronhoskop u traheobronhijalno stablo, dolazi se do željene pozicije, balon se naduva fiziološkim rastvorom kako bi se obezbedio transparentni medijum, postigao maksimalni kontakt sa zidom bronha i dobila kvalitetna ultrazvučna slika. Vrh instrumenta se lagano savije i pritisne na traheobronhijalni zid. Na monitoru se pojavljuju dve slike istovremeno, optička slika pozicije u traheobronhijalnom stablu i ultrazvučna slika struktura iza zida bronha. Pomeranjem vrha instrumenta lokalizuje se limfni čvor koji želimo da uzorkujemo. Vrh instrumenta treba pažljivo pozicionirati tako da se maksimalni prečnik limfnog čvora postavi u centar ultrazvučne slike. Dopler režim se koristi za identifikaciju okolnih vaskularnih struktura, kao i za prikaz vaskularizacije limfnog čvora. Nakon identifikovanja lezije, vrši se fiksiranje omotača igle i plasiranje igle u limfni čvor. Dužina omotača igle se prilagođava i prati pod kontrolom optike. Vrh igle je vidljiv ultrazvukom, vizuelizuje se na ekranu i prati punkcija limfnog čvora (Slika 2).

Manipulisanje iglom je veoma važan segment izvođenja punkcije i aspiracije pod kontrolom ultrazvuka. U slučaju nailaska na hrskavicu tokom punkcije minimalnim pomeranjem vrha bronhoskopa gore dole pozicionira se igla u međuhrskavičavi prostor. Nakon probadanja limfnog čvora, unutrašnji žičani vodič se izvlači, postavlja se špric sa negativnim pritiskom i započinje se sa aspiracijom otvaranjem slavine na špricu. Pomeranjem vrha igle napred na-

zad vrši se punkcija i aspiracija limfnog čvora (slika 3). Dobijeni materijal se razmaže na staklene pločice, osuši na sobnom vazduhu i odmah boji za interpretaciju od strane citopatologa (18,19).

Indikacije za EBUS TBNA

Indikacije za EBUS TBNA su procena zahvaćenosti limfnih čvorova medijastinuma i hilarnih limfnih čvorova, dijagnostika medijastinalnih i plućnih promena. Svi medijastinalni limfni čvorovi osim subortalnih i paraezofagealnih pozicija 5, 6, 8 i 9 su dostupni EBUS TBNA. Hilarni limfni čvorovi pozicije 10,11 su pristupačni za EBUS TBNA osim dela limfnih čvorova pozicije 12. Precizno definisanje stadijuma bolesti određuje tretman karcinoma bronha. Status medijastinalnih limfnih čvorova je odlučujući ukoliko nema udaljenih metastaza. Konvencionalna bronhoskopija i TBP su osnovne metode kod pacijenata sa radiografski dokazanim uvećanim medijastinalnim limfnim čvorovima pored disajnih puteva i obično se izvode kod pacijenata sa karcinomom bronha radi procene zahvaćenosti tumorom ovih medijastinalnih limfnih čvorova u istom postupku. Međutim, konvencionalna TBP je "slepa" procedura, nedostaje vizuelizacija lezije i s toga dijagnostič-



Slika 2. Ultrazvučna slika limfnog čvora i igle koja se nalazi u limfnom čvoru

ki doprinos varira. Radikalni EBUS se koristi za vizuelizaciju medijastinalnih limfnih čvorova i navođenje igle za TBP. I ova metoda nema mogućnost navođenja u realnom vremenu tako da je i njen dijagnostički doprinos različit i varira. EBUS TBNA prevazilazi ove probleme i omogućava izvođenje procedure u realnom vremenu (18-20).

Prvi članak objavljen o dijagnostičkom doprinosu EBUS TBNA u proceni zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova kod karcinoma bronha, ne samo da

je pokazao visok doprinos i sigurnost postupka već je i ukazao na uticaj ove metode u daljem tretmana pacijenata obolelih od karcinoma bronha. Kod 105 pacijenata EBUS TBNA je uspešno izveden i dobijeni su uzorci iz 163 limfna čvora. EBUS TBNA je imao stopu dijagnostičke tačnosti od 96,3%. Pored toga kao rezultat EBUS TBNA izbegnuto je 29 medijastinoskopija, 8 torakotomija i 4 VATS-a, odnosno EBUS TBNA je poštediti pacijente ovih invazivnih procedura u proceni zahvaćenosti limfnih čvorova medijastinuma (21).

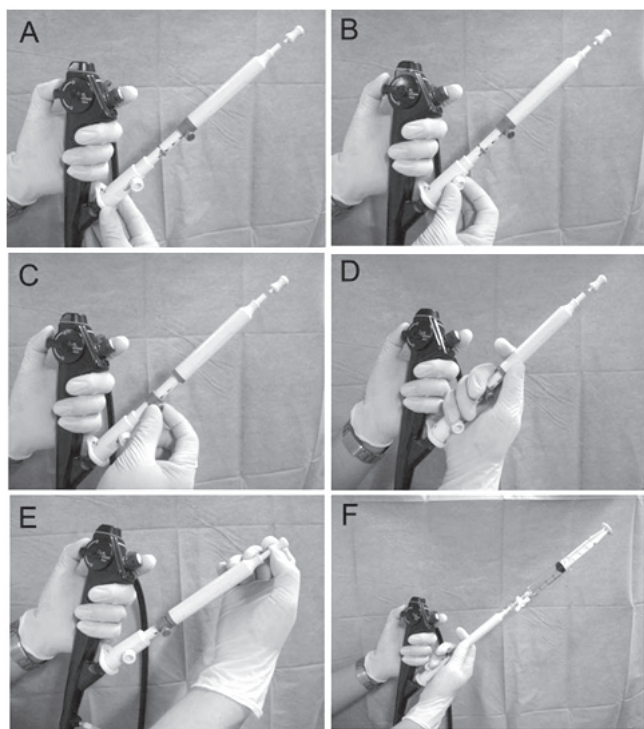
Domet EBUS TBNA je sličan medijastinoskopiji, koja je "zlatni standard" za procenu zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova. Međutim, domet EBUS TBNA je proširen na hilarne limfne čvorove, a kao i kod medijastinoskopije subaortalni i paraezofagealni limfni čvorovi nisu dostupni. Kombinovanjem EBUS TBNA i EUS TBNA većina medijastino-

dijuma medijastinalnih i hilarnih limfnih čvorova iznosila je 76,9%, 80% i 92,3% respektivno. Specifičnost je bila 55,3%, 70,1% i 100%, a dijagnostička tačnost 60,8%, 72,5% i 98%. Dokazano je da EBUS TBNA ima veću senzitivnost i specifičnost u odnosu na CT i PET-CT za medijastinalni stejdžing kod potencijalno resektabilnih pacijenata sa karcinomom bronha. Dijagnostički doprinos EBUS TBNA za procenu N statusa u stejdžingu karcinoma bronha kreće se od 89 do 98% (prosečno 94,5%).

Ponovna procena zahvaćenosti limfnih čvorova medijastinuma (restaging-restejdžing) je još jedna oblast primene EBUS TBNA. U slučaju da je primenjena indukciona hemioterapija (neoadjuvantna hemioterapija) kao prehirurška opcija zbog N2 bolesti potrebno je evaluirati medijastinalni nodalni status. Medijastinoskopija se i dalje smatra za "zlatni standard" procene zahvaćenosti medijastinuma, međutim remedijastinoskopija može biti tehnički teško izvodljiva i ne izvodi se najčešće. Sposobnost više ponavljanja uzorkovanja limfnih žlezda medijastinuma upotrebom EBUS TBNA omogućava precizan restejdžing medijastinuma posle neoadjuvantne hemioterapije. U analizi koja je obuhvatila 124 bolesnika sa dokazanim karcinomom bronha u IIIA stadijumu bolesti sa N2 limfnim čvorovima koji su tretirani indukcionom hemioterapijom urađen je restejdžing uz primenu EBUS TBNA. Senzitivnost, specifičnost i pozitivna prediktivna vrednost (PPV), negativna prediktivna vrednost (NPV) i dijagnostička tačnost EBUS TBNA za restejdžing medijastinuma bila je 76%, 100%, 100%, 20% i 77%. Zaključak ove analize bio je da je EBUS TBNA tačna i minimalno invazivna metoda za restejdžing i procenu zahvaćenosti medijastinuma kod bolesnika sa karcinomom bronha. Međutim zbog niske NPV, bolesnici sa tumor negativnim limfnim čvorovima podvrgavaju se hirurškoj intervenciji (23,24).

Linearni EBUS može se koristiti i u dijagnostici intrapulmonarnih limfnih čvorova. Ograničenje dometa konveksne sonde je zbog veličine bronha i obično se vrh instrumenta može ubaciti do lobarnih bronha ili u segmentne bronhe baze. Plućne lezije koje se nalaze uz disajne puteve mogu se uzorkovati i dijagnostikovati sa EBUS TBNA. Takođe lezije koje se nalaze u vrhu pluća u blizini traheje mogu se lako dijagnostikovati ovom metodom.

Dijagnostika medijastinalnih tumora je još jedno područje upotrebe EBUS TBNA. Medijastinalni tumori koji se mogu dijagnostikovati uključuju bronhogene ciste, maligne limfome, timome, hondrosarkome ili medijastinalnu strumu. U poređenju sa dijagnostikom metastaza karcinoma bronha u limfnim čvorovima, citološka dijagnoza medijastinalnih



Slika 3. Izvođenje EBUS TBNA

nalnih limfnih čvorova su dostupni. Studija koja je poredila (22) EBUS TBNA, CT grudnog koša i PET CT u proceni zahvaćenosti limfnih čvorova za određivanje stadijuma bolesti kod karcinoma bronha pokazala je visok dijagnostički doprinos linearnog EBUS-a. U studiji je bilo uključeno 102 pacijenta (96 sa dokazanim karcinomom i 6 sa radiološkom sumnjom). Sve tri metode su sprovedeno u preoperativnoj proceni medijastinalne i hilarne proširenosti bolesti. EBUS TBNA je uspešno izveden kod svih pacijenata, prosečne starosti 67,8 godina i uzorkovano je 147 medijastinalnih i 53 hilarna limfna čvora. Senzitivnost CT, PET-a i EBUS TBNA za tačnu dijagnozu sta-

tumora je teža, s obzirom da je za ove tumore često neophodna histološka potvrda bolesti. Značajnu ulogu ima EBUS TBNA i u dijagnostici sarkoidoze i potvrđen je njen visok dijagnostički doprinos (25).

Zaključak

Endobronhijalna ultrazvukom vođena transbronhijalna iglena aspiracija sigurna, osetljiva, tačna i minimalno invazivna dijagnostička metoda u proceni zahvaćenosti mediastinalnih limfnih čvorova kod karcinoma bronha. EBUS TBNA ima veću specifičnost, NPV i tačnost u odnosu na konvencionalnu transbronhijalnu punkciju u proceni zahvaćenosti mediastinalnih limfnih čvorova kod karcinoma bronha. Komplikacije su retke i ne razlikuju se od komplikacija koje se mogu javiti tokom konvencionalne bronhoskopije. EBUS TBNA se smatra sigurnom metodom, komplikacije su retke. Prema novim smernicama za invazivnu dijagnostiku karcinoma bronha EBUS TBNA je jedna od novijih tehnologija koja je uvedena kao osnovna metoda u invazivnoj dijagnostici i u mnogim centrima upravo je ova metoda smanjila potrebu za hirurškom pretragom mediastinuma.

Literatura

1. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. American College of Chest Physicians. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007; 132:149S-160S.
2. Spiro SG, Silvestri G. One Hundred Years of Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 523-9.
3. Herth F, Eberhardt R, Ernst A. The Future of Bronchoscopy in Diagnosing, Staging and Treatment of Lung Cancer. *Respiration* 2006;73:399-409.
4. F J F Herth, R Eberhardt, P Vilmann, M Krasnik, A Ernst Real-time endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for sampling mediastinal lymph nodes. *Thorax*. 2006 ; 61(9): 795-798.
5. Groth S, Andrade R, Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration for Mediastinal Lymph Node Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2008; 20 (4): 274-278
6. Szlubowski A, Kuzdzał J, Kołodziej M. et al. Endobronchial ultrasound-guided needle aspiration in the non-small cell lung cancer staging. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2009; 35: 332-336
7. Gu P, Zhao ZY, Jiang LY et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer* 2009; 45: 1389-1396
8. Goldstraw P. ed. International Association for the Study of Lung Cancer. IASLC Staging Manual in Thoracic Oncology. Orange Park, FL: Editorial Rx Press 2009.
9. Goldstraw P. The 7th edition of TNM in lung cancer: what now? *J Thorac Oncol*. 2009; 4 (6): 671-3.
10. Silvestri G, Gould M, Margolis M, Tanoue L, McCrory D, Toloza E, Detterbec F. Noninvasive Staging of Non-small Cell Lung Cancer: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007; 132:178S-201S.
11. Birim O, Kappetein AP, Stijnen T, Bogers AJ. Meta-analysis of positron emission tomographic and computed tomographic imaging in detecting mediastinal lymph node metastases in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005;79:375-82.
12. Plekker D, Koegelenberg CFN, Bolliger CT. Different techniques of bronchoscopy. *Eur Respir Mon*, 2010; 48: 1-17.
13. Detterbeck F, Jantz M, Wallace M, Vansteenkiste J, Silvestri G. Invasive Mediastinal Staging of Lung Cancer: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007; 132:202S-220S.
14. Ernst A, Anantham D, Eberhardt R, Krasnik M, Herth F. Diagnosis of Mediastinal Adenopathy-Real-Time Endobronchial Ultrasound Guided Needle Aspiration versus Mediastinoscopy. *J Thorac Oncol*. 2008;3: 577-82.
15. Herth FJ, Becker HD, Ernst A. Ultrasound guided transbronchial needle aspiration: an experience in 242 patients. *Chest* 2003; 123:604-7.
16. Herth F, Becker HD, Manegold C, Drings P. Endobronchial ultrasound (EBUS): assessment of a new diagnostic tool in bronchoscopy for staging of lung cancer. *Onkologie* 2001;24:151-54.
17. Yasufuku K, Chhajed PN, Sekine Y. et al. Endobronchial ultrasound using a new convex probe: a preliminary study on surgically resected specimens. *Oncol Rep*. 2004; 11: 293-96.

18. Ernst A. and Herth FJF. Endobronchial Ultrasound, An Atlas and Practical Guide Springer Science+Business Media, LLC 2009.
19. Balamugesh T and Herth FJF. Endobronchial ultrasound: A new innovation in bronchoscopy. Lung India. 2009; 26(1): 17-21.
20. Herth F, Krasnik M, Yasufuku K. et al. Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration – How I Do It. J Bronchol. 2006; 13(2): 84-91.
21. Yasufuku K, Chiyo M, Koh E. et al. Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer. Lung cancer. 2005; 50:347-54.
22. Yasufuku K, Nakajima T, Motoori K. et al. Comparison of endobronchial ultrasound, positron emission tomography, and computed tomography for lymph node staging of lung cancer. Chest. 2006; 130: 710-18.
23. Herth FJ, Ernst A, Yasufuku K. et al. Endobronchial ultrasound with transbronchial needle aspiration for restaging the mediastinum. J Thorac Oncol. 2007; 2: 361S–362S.
24. Szlubowski A, Herth FJF, Soja J, Kołodziej M, Figura J, C'miel A, Obrochta A, Pankowski J. Endobronchial ultrasound-guided needle aspiration in non-small-cell lung cancer restaging verified by the transcervical bilateral extended mediastinal lymphadenectomy - a prospective study. European Journal of cardio-thoracic surgery 2010; 37: 1180-1184
25. Garwood S, Judson MA, Silvestri G. et al. Endobronchial ultrasound for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. Chest. 2007; 132: 1298-304.

AUTOFLUORESCENTNA VIDEOBRONHOSKOPIJA I VIDEOBRONHOSKOPIJA USKOG SNOGA SVETLOSTI U DIJAGNOSTICI KARCINOMA BRONHA

AUTOFLUORESCENCE VIDEOBRONCHOSCOPY AND NARROW BAND IMAGING VIDEOBRONCHOSCOPY IN LUNG CANCER DIAGNOSTICS

Zarić Bojan, Stojšić Vladimir, Kovačević Tomi, Perin Branislav

Korespondencija:

Ass. dr sc. med. Bojan Zarić

KLINIK ZA PULMOLOŠKU ONKOLOGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica

Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:56-66

SAŽETAK

Savremene bronhoskopske tehnike za detekciju i dijagnostiku pre-malignih lezija i karcinoma bronha ušle su u svakodnevnu primenu u velikom broju bronhoskopskih centara širom sveta. Dve najčešće korištene su autofluorescentna videobronhoskopija (AFI) i videobronhoskopija uskog snopa svetlosti (NBI). Obe ove tehnike su komplementarne i veoma jednostavne za primenu u dobro opremljenim centrima za respiratornu endoskopiju, a dostupne su u Institutu za plućne bolesti Vojvodine. Svaka od tehnika ima svoje prednosti i nedostatke. Cilj ovog preglednog članka je upoznavanje šire pulmološke i medicinske javnosti sa tehnologijom, indikacijama i dijagnostičkom vrednošću ovih invazivnih pulmoloških tehnika.

Ključne reči: autofluorescentna videobronhoskopija; bronhoskopija; karcinom bronha; videobronhoskopija uskog snopa svetlosti.

SUMMARY

Advanced bronchoscopic techniques for detection and diagnostics of pre-malignant lesions and invasive lung cancer have entered every day routine practice in large number of bronchology centers worldwide. Two techniques most commonly used for early detection and diagnostics are autofluorescence videobronchoscopy (AFI) and narrow band imaging videobronchoscopy (NBI). Both techniques are complementary and easy for use in well equipped respiratory endoscopy units. Both are also available at Institute for pulmonary diseases of Vojvodina. each technique has unique advantages and disadvantages. The aim of this review article is overview of technology, indications and diagnostic yield and introduction of these techniques to pulmonology and general medical public.

Keywords: autofluorescence imaging; bronchoscopy; lung cancer; narrow band imaging.

Uvod

Tokom proteklih dvadesetak godina bronhologija odnosno interventna pulmologija postala je jedna od grana pulmologije i interne medicine koja boleži najbrži razvoj kako u tehnološkom pogledu tako i po uspesima u dijagnostičkoj i terapijskoj primeni ovih tehnika. Tehnike interventne pulmologije podeljene su u dijagnostičke i terapijske. Dijagnostičke tehnike upotrebljavaju se za postavljanje dijagnoze mnogobrojnih plućnih oboljenja: karcinoma bronha, pneumonija, tuberkuloze, sarkoidoze, vaskulitisa i

brojnih drugih oboljenja. Pored ovoga, dijagnostičke tehnike upotrebljavaju se i za određivanje stadijuma proširenosti pojedinih oboljenja, a najviše karcinoma bronha (1-12).

U ove dijagnostičke tehnike spadaju: konvencionalna videobronhoskopija bele svetlosti sa uvećanjem (white light (magnifying) videobronchoscopy – WLB), autofluorescentna videobronhoskopija (autofluorescence imaging videobronchoscopy – AFI), videobronhoskopija uskog snopa svetlosti (narrow band imaging videobronchoscopy – NBI), linearni i radijalni endobronhijalni ultrazvuk (endobronchial ultrasound – EBUS) sa pripadajućim tehnikama

uzimanja uzoraka kao što su bronho-biopsija, transbronhijalna biopsija, transbronhijalna iglena punkcija, endobronhijalna četka-biopsija, elektromagnetna navigaciona bronhoskopija (EMN), kriobiopsija i druge. Terapijske interventne pulmološke tehnike podeljene su na one sa trenutnim dejstvom (dejstvo se vidi odmah nakon intervencije) i one sa odloženim dejstvom čiji efekat je vidljiv tek nakon nekoliko sati ili dana. Tehnike sa trenutnim dejstvom su: laser resekcija, elektroauterizacija, argon plazma koagulacija, plasiranje metalnim, silikonskih ili hibridnih stenova. U tehnike sa odloženim dejstvom spadaju: endobronhijalna brahiterapija, krioterapija, i fotodinamska terapija (13-20).

U proteklih desetak godina, fiber-optičku bronhoskopiju ili fleksibilnu bronhoskopiju kako je često nazivana u stručnim krugovima, u potpunosti je zamenila videobronhoskopija. Razlika između ove dve tehnike jeste suštinski u načinu stvaranja i prenosa svetlosnih impulsa. Dok je kod fiber-optičke bronhoskopije ovakva transmisija i transformacija signala tekla preko fiber-optičkih vlakana, danas ova tehnologija u potpunosti ovisi o charged-couple device sistemu odnosno CCD kameri koja se nalazi na distalnom kraju bronhoskopa.

Na ovaj način omogućena je reprodukcija slike u visokoj rezoluciji, detekcija detalja ali i višestruko uvećanje slike radi posmatranja arhitektonike bronhijalne sluznice. Omogućena je i detekcija vrlo ranih pre-malignih lezija u bronhijalnoj sluznici a njihovo izučavanje moglo bi značajno pridoneti razumevanju karcinogeneze kod karcinoma bronha.

Autofluorescentna videobronhoskopija (Autofluorescence Imaging videobronchoscopy - AFI)

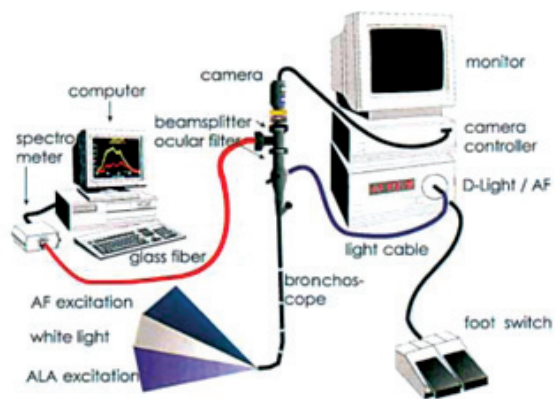
Autofluorescentna videobronhoskopija (AFI) je jedna, relativno nova optička tehnika videobronhoskopije primarno dizajnirana za detekciju i detaljan pregled intraepitelijalnih promena bronhijalne sluznice. Ovom tehnikom se najbolje zapažaju promene nastale u epitelu sluznice bronha. Integracijom sistema AFI sa videobronhoskopskim sistemima visoke moći povećanja dobijen je hibridni sistem autofluorescentne videobronhoskopije sa uvećanjem slike, visoke rezolucije što omogućuje detekciju vrlo suptilnih promena citoarhitektonike sluznice bronha. Jasná distinkcija između normalnog i patološkog epitela, čini ovu tehniku veoma pogodnom za primenu u jedinicama respiratorne endoskopije (21-23).

Osnovne indikacije za primenu AFI uključuju detekciju i identifikaciju pre-malignih lezija epitela sluznice bronha, praćenje bolesnika nakon kurativne resekcije skvamoznog karcinoma bronha, prošireni stejdžing u smislu detekcije sinhronih tumora i endoskopsku procenu ekstenzivnosti karcinoma bronha. Strma kriva učenja (learning curve) i jasna distinkcija između patološkog i normalnog epitela čine ovu tehniku posebno dobrom za mlade interventne pul-

mologe. Jedan od osnovnih nedostataka ove tehnologije je njena niska specifičnost u detekciji pre-malignih lezija, obzirom da i inflamacija predstavlja patološko stanje koje rezultira izmenjenom fluorescencijom sluznice. Ovaj, na prvi pogled, ozbiljan nedostatak danas se prevazilazi inovacijama u domenu optičkog imidžinga. Dodavanje ultra-ljubičastog spektra, merenje reflektance, analiza reflekovane rase svetlosti, dvostruki digitalni imidžing ili fluorescentno-reflektantni spektar, predstavljaju inovacije u domenu AFI koje značajno poboljšavaju specifičnost u detekciji ranih pre-malignih lezija. Danas postoje i brojna softverska rešenja i programi čiji je cilj objektivizacija (auto)fluorescence, njena kvantifikacija i korelacija sa pojedinim vrstama lezija sluznice bronha. Treba istaći, da AFI ima prihvatljivu specifičnost u ostalim indikacijama kao što je procena ekstenzivnosti malignog procesa, praćenje efekata terapije nakon resekcije i detekcija sinhronih tumora (24-30).

Prvi sistemi za autofluorescentnu bronhoskopiju pojavili su se krajem osamdesetih i početkom devedesetih godina prošlog veka. Ovi su sistemi bili bazirani na fiber-optičkoj bronhoskopiji i intravenskom davanju kontrastnih materija koje su više apsorbovane od strane patološkog tkiva sluznice bronha. Prvi sistem proizveden je u Kanadi i nazvan LIFE (Light Induced Fluorescence Endoscopy) (Xillix Technologies Corp. Richmond, Kanada). Ovaj sistem prvi je zabeležio dobre rezultate i ušao je u upotrebu, sa ciljem detekcije ranih lezija u SAD i Kanadi. Međutim ovaj sistem, bio je izuzetno glomazan, težak za inkorporaciju u standardu opremu jedinice za respiratornu endoskopiju i prilično neprecizan. Pandam LIFE sistemu u Evropi postao je D-Light AF system, Karl Storz, Tuttlingen, Njemačka. Šematski je ovaj sistem prikazan na slici tri, koja objašnjava komplikovanost i veličinu ovog sistema. Sistem je podrazumevao fiber-optički bronhoskop, konektovan na ispravljač i povezan sa računarom radi analize slike, posebnu konekciju bronhoskopa sa video-sistemom i procesorom, kao i posebnu konekciju sa izvorom svetlosti i vezu procesora sa prekidačem u vidu pedala. Dodatno je morala da postoji kamera priključena za bronhoskop a potom i veza kamere i procesora. Ovakav dizajn je obeshrabrio mnoge pionire u domenu autofluorescentne bronhoskopije. Ovaj vid autofluorescentne bronhoskopije postao je isključivo istraživačka tehnologija, koja se što zbog cene, što zbog komplikovane opreme koristila samo u velikim naučno-istraživačkim centrima.

Sa pojavom videobronhoskopije, CCD kamera i brzih procesora, integracija autofluorescence sa konvencionalnom bronhoskopijom postala je pitanje vremena. Ubrzo su napravljeni prototipovi autofluorescentnih videobronhoskopa koji su kroz nekoliko godina ušli u komercijalnu upotrebu. Ovi savremeni sistemi na tržištu su oko deset godina i još uvek se koriste mahom u istraživačke svrhe, iako je danas sve veći broj studija koje potvrđuju njihovu efikasnost u svakodnevnom radu jedinice za respiratornu endoskopiju (31-46).



Slika 1. D-Light/AF sistem prikazan šematski. (Izvor: World Wide Web)



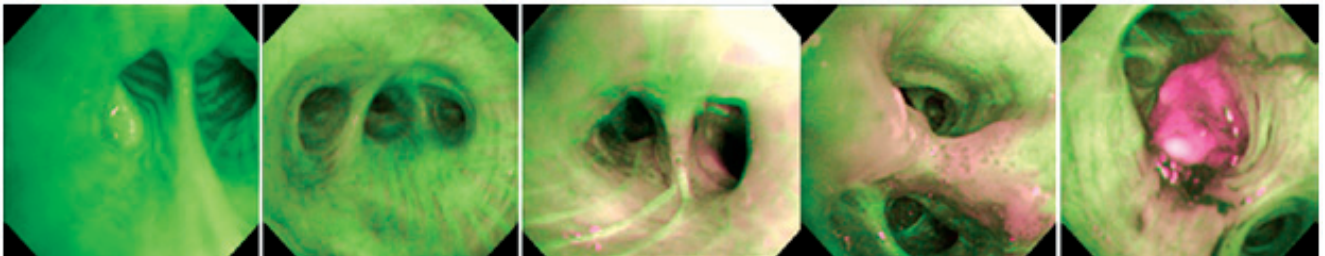
Slika 2. BF-F-260 videobronhoskop



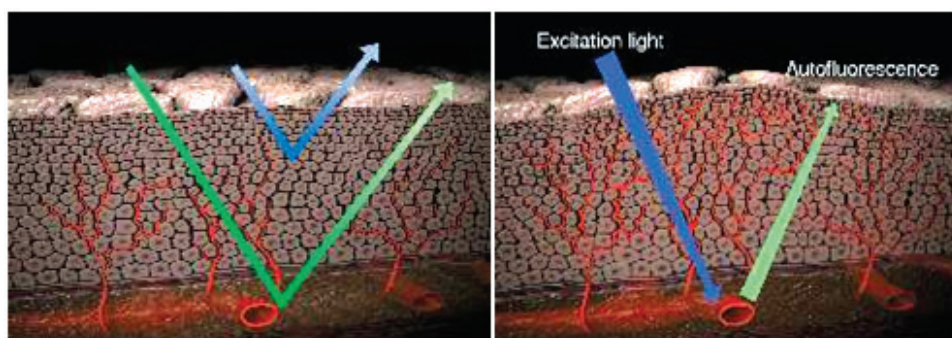
Slika 3. Videoprocetor klase EVIS LUCERA SPECTRUM



Slika 4. Ksenonski izvor svetla (Xenon bulb) CLV-260SL



Slika 5. Na slici osam prikazana je distribucija boja AFI pregledom, sa leve na desnu stranu: normalna sluznica, bronhitis, displazija, carcinoma in situ i maligni tumor.



Slika 6. Normalan epitel bronhijalne sluznice i normalna refleksija svetlosti uključujući i AF signal (leva strana, zelena strelica) i atenuacija AF signala na malignoj sluznici (desno, zelena strelica) (Izvor: world wide web)

Veliki broj studija urađen je na ovim fiber-optičkim sistemima autofluorescentne bronhoskopije, i upravo rezultati ovih studija su razlog zašto je specifičnost AF danas u meta-analizama još uvek niska. Pažljivim odabirom studija rađenih na video CCD sistemima meta analize pokazuju sve veći stepen specifičnosti. Svaki sistem autofluorescentne videobronhoskopije ima svoje specifičnosti, predmet ovog doktorata je AFI sistem - Olympus Medical Systems Co., Tokyo, Japan, pa će njemu biti posvećeno najviše pažnje.

Osnovu svih ovih sistema čini fenomen fluorescencije. Još 1943. godine Hereley je primetio fluorescentnu reakciju tkiva obasjanog ultra-ljubičastom svetlošću i još tada je ustanovljeno da tumori fluoresceriraju drugačije od zdravog tkiva. Supstance odgovorne za fluorescenciju se nazivaju fluorofore. One pokazuju organ specifične karakteristike, koncentracija u pojedinim tkivima i organima ima varira i njihova koncentracija u mnogome zavisi od opšteg stanja organizma. Fluorofora ima mnogo, ali najznačajnije među njima su: triptofan, kolagen, elastin, porfirini, flavini i materije koje učestvuju u metabolizmu NAD/NADH. Talasna dužina i intenzitet (jačina) svetlosti emitovane iz fluorofora zavise od njihove koncentracije, maksimalne apsorpcije, refleksije i naravno karakteristika egzogenog izvora svetlosti. Kada svetlost određene talasne dužine obasja fluorofore u sluznici šupljih organa, one počinju da emituju svetlost (izuzetno slabu svetlost, niskog intenziteta). Sistemi autofluorescentne videobronhoskopije, dizajnirani su da uhvate, pojačaju i detektuju ovaj slab svetlosni signal, potom ga transformišu u digitalni impuls, obrade u procesoru i prikazu na ekranu u boji. Razlog za izmenjenu fluorescenciju patološkog procesa (tumora, inflamacije, krvarenja) leži u smanjenoj fluorescenciji patološkog procesa. Dakle fluoresceriranje, kao prirodan proces, je u zadebljalom ili maligno izmenjenom epitelu sniženo, upravo zato na ekranu nakon obrade ovog signala postoji slika koja se razlikuje od slike koju daje normalan epitel. Ova atenuacija dešava se zbog zadebljanja epitela, hiperemije u tumoru ili promeni (hemoglobin apsorbuje gotovo ceo spektar zelene svetlosti), redox promena u tumorskom matriksu i smanjenja koncentracije fluorofora u tumorskom tkivu (47-55).

AFI sistem (Olympus Medical Systems Co, Tokio, Japan) sasoji se iz autofluorescentnog videobronhoskopa BF-F-260 (Slika 2), videoprocera klase EVIS LUCER SPECTRUM (CV-260SL) (Slika 3) i ksenonskog izvora svetlosti označenog kao (CLV-260SL Slika 4). HDTV (high definition television – HDTV) monitor bilo koje klase može biti konektovan na videoprocera, najčešće je to matični monitor LCD OEV-191.

Videoprocera klase EVIS LUCERA SPECTRUM baziran je na crno beloj CCD čip tehnologiji, kod koje se separacija boja postiže preko RGB (red, green, white) filtera boja, koji se opremljen izvorom svetlosti. AFI sistem koristi CCD čip visoke rezolucije na distalnom kraju EVIS LUCERA SPEC-

TRUM BF-F260 videobronhoskopa. Pored plave ekscitacione svetlosti, talasnih dužina od 390 nm do 440 nm, koja uzrokuje autofluorescenciju, AFI sistem koristi i zelenu svetlost talasne dužine 540-550 nm koja je uglavnom apsorbovana od strane hemoglobina. Ove dve komponentne svetlosti hvata CCD čip na vrhu videobronhoskopa i pretvara ih u električne signale. Granični filter ispred CCD kamere smanjuje ekscitativnu plavu svetlost i omogućuje detekciju slabog autofluorescentnog signala. Drugim rečima rečeno autofluorescentna reflektovana svetlost, talasnih dužina između 390-690 nm, oslabljena je kada plava svetlost (390-440 nm) obasja neoplastičnu leziju. Svetlost talasne dužine 540-560 nm biva uglavnom apsorbovana od strane komponenti krvi. Oba ova tipa svetlosti prolaze prethodno opisan put detekcije od strane CCD čipa, konverzije i prezentacije na monitoru.

U videoprocera, autofluorescentni svetlosni signal pretvara se u zeleni spektar, a zelena reflektovana svetlost se pretvara u crveni i plavi spektar. Tako obrađena slika se sintetiše u procesoru i projektuje na ekranu. Normalna slika AFI je zato zelena, dok su patološki procesi tamno zeleni a jače izražene patološke promene su ljubičaste i tamno smeđe boje (slika 5). Slika 6 šematski prikazuje normalnu i atenuiranu refleksiju AF signala.

Ostali savremeni sistemi autofluorescentne videobronhoskopije rade na istom principu kao AFI. Svaki sistem ima određene modifikacije po pitanju talasnih dužina ekscitacione svetlosti. Ovde pripadaju, osavremenjeni LIFE sistem (Xillix Technologies Corp, Richmond, Kanada) koji kao izvor svetlosti koristi kadmijumski laser, D-Light (Karl Storz Endoscopy, Tuttlingen, Njemačka), DAFE (Richard Wolf Endoskopie, Knittlingen, Nemačka), AF Pentax SAFE 3000 (Hoya-Pentax Corp, Tokio, Japan), i novi Onco-LIFE (Xillix Technologies Corp, Richmond, Kanada) (2-10).

Vizuelna klasifikacija promena viđenih autofluorescentnom videobronhoskopijom predložena od strane Herth-a i saradnika danas je postala osnova ovog pregleda. Ova klasifikacija predstavljena je u tabeli 1, adaptirano iz *Zaric B. et al. Expert Rev Med Devices 2011.*

Velika većina do sada objavljenih studija su evaluirale značaj AFI u dijagnostici pre-malignih lezija karcinoma bronha. Rezultati ovih studija uglavnom su potvrdili veću senzitivnost AFI od WLB (white light videobronchoscopy) kada je detekcija ranog stadijuma karcinoma bronha u pitanju. Niska specifičnost AFI je karakteristična za detekciju pre-malignih lezija. Kada se ova tehnologija upotrebljava u dijagnostici sinhronih tumora, praćenju bolesnika nakon resekcije karcinoma bronha ili u proceni ekstenzivnosti bolesti, specifičnost nije niska, već štaviše statistički značajno viša od WLB.

Velika većina do sada objavljenih studija su evaluirale značaj AFI u dijagnostici pre-malignih lezija karcinoma bronha. Rezultati ovih studija uglavnom su potvrdili veću senzitivnost AFI od WLB (white light videobronchoscopy)

Tabela 1. Vizuelna klasifikacija endobronhijalnog nalaza tokom autofluorescentne videobronhoskopije

Stepen	AFI
Normalno	Zelena slika sa normalnom endobronhijalnom arhitektikom
Abnormalno, ali nije sumnjivo na malignitet	Blago smanjenje intenziteta fluorescencije, slabo definisane margine, tamno zelene boje ili blede ljubičasto
Sumnjivo na intraepitelijalnu neoplaziju	Definitivno smanjenje fluorescencije, jasno definisane margine procesa, braon ili ljubičasto, vidljiva izmenjena arhitektika sluznice.
Tumor	Vidljiv tumor, tamno ljubičast ili smeđ.

kada je detekcija ranog stadijuma karcinoma bronha u pitanju. Niska specifičnost AFI je karakteristična za detekciju pre-malignih lezija. Kada se ova tehnologija upotrebljava u dijagnostici sinhronih tumora, praćenju bolesnika nakon resekcija karcinoma bronha ili u proceni ekstenzivnosti bolesti, specifičnost nije niska, već štaviše statistički značajno viša od WLB.

Debata oko upotrebe AFI kao tehnike za skrining još uvek traje, iako je 2005. godine na osnovu rezultata objavljenih u najvećoj evropskoj multicentričnoj studiji od strane Haussinger- a i saradnika (25) zaključena da se AFI ne koristi kao skrining tehnika za karcinom bronha. Međutim u slučajevima kada postoji jasno definisana rizična grupa, kao što su hronični pušači ili rudari, AFI može biti korištena kao endoskopska tehnika skrininga. Ova studija nedvosmisleno je dokazala superiornost AFI u odnosu na WLB u detekciji pre-malignih lezija. Specifičnost AFI značajno varira, a zavisi kako od sistema čija je efikasnost ispitivana, tako i od karakteristika populacije koja je ispitivana. Različite specifičnosti i senzitivnosti AFI, u koparaciji sa sistemom prikazane su u tabeli 2.

Tabela 2. Senzitivnost i specifičnost u korelaciji sa sistemom AFI u detekciji pre-malignih i malignih lezija.

Autor	Sistem	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)
Chiyo M.	AFI	80	83.3
Chiyo M.	LIFE	96.7	36.6
Häußinger L.	D-Light	82.3	58.4
Ueno K.	AFI	94.7	71.1
Chhajed P.N.	LIFE	96	23
Lam B.	SAFE-1000	91.7	26.4
Stringer M.R.	LIFE	84.4	60.7
Hanibuchi M	SAFE-1000	96.8	56.1
Beamis J.F.	D-Light	61.2	75.3
Ernst A.	D-Light	66	73
Herth F.J.F.	AFI	65	40
Hirsch F.R.	LIFE	73	46
Edell E.	Onco-LIFE	44	75
Cetti EJ	AFI	93.3	81.8
Chen W	Meta analysis	90	56
Sun J	Meta analysis	94.7	60.9

Pored zavisnosti od sistema i karakteristika populacije koja se posmatra, specifičnost AFI pokazuje velike varijacije u odnosu na stepen pre-maligne lezije. Senzitivnost je manja za detekciju skvamozne metaplazije i različitih stepena displazije u odnosu na karcinom in situ. Buduće studije treba da omoguće kategorizaciju pre-malignih lezija, po endoskopskom izgledu ili potencijalu maligne alteracije i potom na standardizovan način odrede specifičnost i senzitivnost za svaki tip lezije (20-29). Naravno ovakav pristup zahteva dodatna tehnička, kako hardverska tako i softverska unapređenja ove tehnologije. Danas postoje sistemi i eksperimentalni modeli koji evaluiraju in vivo spektroskopiju, analizu reflektovane crvene svetlosti, ili analizu reflektovane ultraljubičaste svetlosti kao i autofluorescentnu spektroskopiju sa ljubičastim ekscitirajućim svetlom (47-52). Odlične rezultate objavio je Edell i saradnici (35) na još uvek prototipu novog sistema nazvanog Onco-LIFE (Xillix Technologies Corp., Richmond, Kanada) gde je relativna senzitivnost, izračunata i na odnosu po leziji i po pacijentu, ukazala na apsolutnu premoć AFI videobronhoskopije u dijagnostici pre-malignih lezija. Novije studije potvrdile su visoku dijagnostičku vrednost AFI videobronhoskopije u svakodnevnoj kliničkoj praksi jedinice za respiratornu endoskopiju. Pierrard i saradnici (40) dokazali su povećanje detekcije sinhronih tumora sa 7% videobronhoskopijom bele svetlosti na 23% sa dodatkom AFI, a u studijama publikovanim od strane naše bronhološke grupe dokazana je efikasnost u proceni ekstenzivnosti bolesti sa mogućim značajnim uticajem na dalji terapijski postupak. AFI dakle ima indikacije za detekciju pre-malignih lezija kod grupa sa rizikom, u bronhoskopskom praćenju nakon kurativne resekcije, i u evaluaciji endobronhijalne ekstenzije primarnog tumora (5-25).

gnostičku vrednost AFI videobronhoskopije u svakodnevnoj kliničkoj praksi jedinice za respiratornu endoskopiju. Pierrard i saradnici (40) dokazali su povećanje detekcije sinhronih tumora sa 7% videobronhoskopijom bele svetlosti na 23% sa dodatkom AFI, a u studijama publikovanim od strane naše bronhološke grupe dokazana je efikasnost u proceni ekstenzivnosti bolesti sa mogućim značajnim uticajem na dalji terapijski postupak. AFI dakle ima indikacije za detekciju pre-malignih lezija kod grupa sa rizikom, u bronhoskopskom praćenju nakon kurativne resekcije, i u evaluaciji endobronhijalne ekstenzije primarnog tumora (5-25).

Videobronhoskopija uskog snopa svetlosti (Narrow Band Imaging videobronchoscopy - NBI)

NBI je nova tehnika respiratorne endoskopije dizajnirana za evaluaciju submukozne kapilarne mreže bronhijalne sluznice. Pomoću ove tehnike jasno se može vizuali-

zovati patološki izmenjena submukozna i mukozna mreža kapliara. Kombinacija videobronhoskopije sa uvećanjem i NBI videobronhoskopije pokazala je veliki potencijal u detekciji pre-malignih i malignih lezija karcinoma bronha. Preliminarne studije pokazale su nadmoć NBI videobronhoskopije nad videobronhoskopijom bele svestlosti (white light videobronchoscopy) ili konvencionalnom videobronhoskopijom u dijagnostici karcinoma bronha (26-34).

Patološka slika mikrokapilarne mreže bronhijalne sluznice, koja se pojavljuje kod malignih ali i pre-malignih lezija opisana je od strane Shibuya-e i saradnika i postala opštepoznata kao Šibujini deskriptori. Ovaj patološki nalaz podrazumeva vizualizaciju tri karakteristična kapilara obrasca, to su tačkasti krvni sudovi, izvijugani krvni sudovi i krvni sudovi koji se naglo završavaju. Patološki obrasci mikrokapilarne mreže bronhijalne sluznice prikazani su na slikama 7-9 (35-41).

Bronhoskopija uskog snopa svetlosti po definiciji je tehnika optičkog pojačavanja slike koja pojednostavljuje vizualizaciju bronhijalne sluznice i submukoznih kapilara. Ova nova tehnika omogućuje endoskopisti da prikupi detaljnije informacije o patološki promenjenoj sluznici organa koji su dostupni endoskopskom pregledu kao što su ždrelce, jednjak, želudac, duodenum, bronhi, debelo crevo i mokraćna bešika.

NBI je široko primenjena u digestivnoj endoskopiji i naročito dobro se pokazala u dijagnostici Baretovog ezofagusa, u diferenciranju adenomatoznih polipa debelog creva od invazivnog karcinoma i u detekciji karcinoma mokraćne bešike. Dakle NBI stvara kontrastno pojačanu sliku krvnih sudova u površinskim delovima sluznice. Obzirom da je neoangiogeneza osnovni postulat karcinogeneze jasno je da detekcija novo nastalih, karakterističnih krvnih sudova omogućava detekciju maligno alterisanih promena. Sa druge strane, ona omogućava uzimanje biopsija sa ovih promena i izučavanje ranih dešavanja u karcinogenezi. Stvaranje ovako pojačane, karakteristične slike moguće je nakon iradijacije tj. obasjavanja tkiva sa dva izolovana snopa svetlosti određenih talasnih dužina (42-45).

NBI sistem koristi plavi uski snop svetlosti, talasne dužine od 390-445 nm za detekciju tankih krvnih sudova površinskog sloja sluznice i zeleni uski snop svetlosti, talasne dužine 530-550 nm, koji je odgovoran za vizualizaciju debljih snopova kapilara u dubljem sloju sluznice. Sužavanjem spektra svetlosti postiže se različita penetracija i refleksija svetla kroz i u bronhijalnu sluznicu što rezultira boljim kontrastom i boljom vidljivošću malih krvnih sudova. Slika 10 i 11 prikazuju šematski sužavanje snopa svetlosti i adekvatnost vizualizacije krvnih sudova sluznice bronha (46-49).

Slika 10 prikazuje kako svetlosti pojedinih talasnih dužina označene različitim bojama, različito prodiru u dubinu bronhijalne sluznice, omogućujući pri tom vizualizaciju krvnih sudova različitih slojeva sluznice, što je od velikog praktičnog značaja za razlikovanje pre-malignih od malignih lezija odnosno invazivnog karcinoma.

Prve dve slike sa leva na desno (slika 11) su nastale sužavanjem snopa svetlosti i na njima se kapilari površinskog i srednjeg sloja jasno razabiru. Poslednja slika je u stvari slika koja nastaje obasjavanjem punom belom svetlošću gde vaskularna arhitektura nije jasno vidljiva.

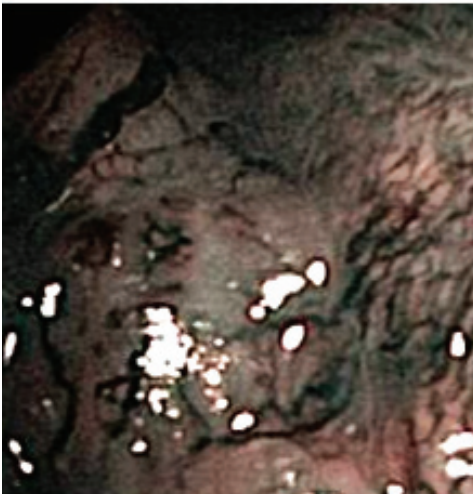
Tehničku osnovu NBI čine dva osnovna videoendoskopska sistema koja se najčešće koriste u respiratornoj endoskopiji. Razlika između ova dva sistema leži u različitom načinu sinteze HDTV slike u boji. Sistem nazvan EVIS EXERA II (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan) bazira se na CCD čipu u boji koji ima nekoliko malih kolor filtera po svakom pikselu slike. Drugi sistem nazvan EVIS LUCERA SPECTRUM baziran je na crno belom CCD čipu, i u njemu se kolor separacija postiže upotrebom crveno-zeleno-plavog (RGB) kolor filtera na koji je priključen izvor svetlosti. RGB filter se sastoji od tri širokopojasna filtera i pokriva opseg talasnih dužina od 400 nm do 800 nm. Oba ova sistema podjednako podržavaju NBI tehnologiju i oba koriste ksenonski izvor svetlosti. Isti optički filter na svetlosnom izvoru inkorporiran je u oba sistema i stoga se može reći da su ova dva sistema optički jednaki. Međutim, sistemi se međusobno ipak razlikuju u jednoj važnoj komponenti a to je artefijalna sintetička slika koju reprodukuju.

Razlika između ova dva sistema je u AFI tehnologiji koju Lucera podržava ali Exera II nije u stanju da je reprodukuje. Kada je NBI tehnologija u pitanju, oba sistema obezbeđuju stvaranje izvrsnog kontrasta u detekciji mikro kapilarne mreže bronhijalne sluznice. Pored optičkih razlika, ova dva sistema se razlikuju i u mogućnostima digitalnog uvećavanja slike. Sistem baziran na CCD čip tehnologiji u boji, dakle Exera II opremljena je sa digitalnim zoom-om za uvećanje od 1.2 – 1.5 puta. Međutim, videobronhoskop visoke rezolucije opremljen je sa fizičkim uvećanjem koje omogućuje približavanje bronhoskopa na svega 2 mm od površine sluznice bez smanjenja rezolucije slike, što omogućava uvećanje od 50 puta. Lucera međutim ima optički sistem koji omogućuje uvećanje slike do 80 puta. Naravno u stvarnoj kliničkoj praksi ovakva uvećanja je ipak veoma teško postići, obzirom na brojne faktore koji utiču na njih (od karakteristika tkiva do kvaliteta monitora) (50-56).

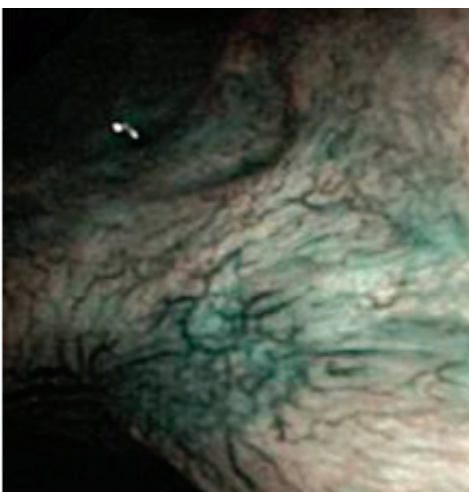
Kombinacijom HD (high-definition) tehnologije i NBI omogućena je vizualizacija bronhijalne sluznice u obliku koji da sada nije bio moguć. Iz svega navedenog, može se zaključiti da Lucera ima ipak blagu prednost nad Exerom II. Princip NBI počiva na činjenici da je najadekvatnija talasna dužina za identifikaciju površinskih kapilara 415 nm, dok talasna dužina od 540 nm najbolje odgovara posmatranju debljih krvnih sudova u dubini sluznice. EVIS EXERA II sistem sastoji se iz ksenonskog izvora svetlosti koji je instaliran ispred optičkog filtera za NBI. Ovaj optički filter je filter za dva snopa koji propušta talasne dužine svetlosti od 415 nm i 540 nm. Filter cepa svetlost na ova dva snopa koji potom obasjavaju sluznicu bronha. Da bi se stvorila slika u boji na monitoru visoke rezolucije svetlost mora da se provede kroz R, G



Slika 7. Karakteristični tačkasti krvni sudovi, karina ušća za desni gornji režanj, skvamozni karcinom bronha.

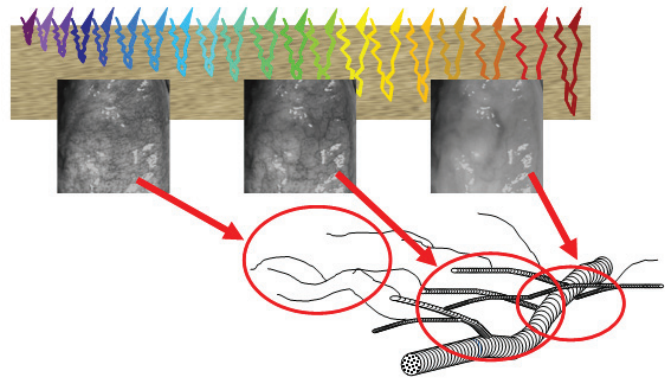


Slika 8. Karakteristični izvijugani krvni sudovi, tumor u ušću za srednji režanj, adenoskvamozni karcinom.

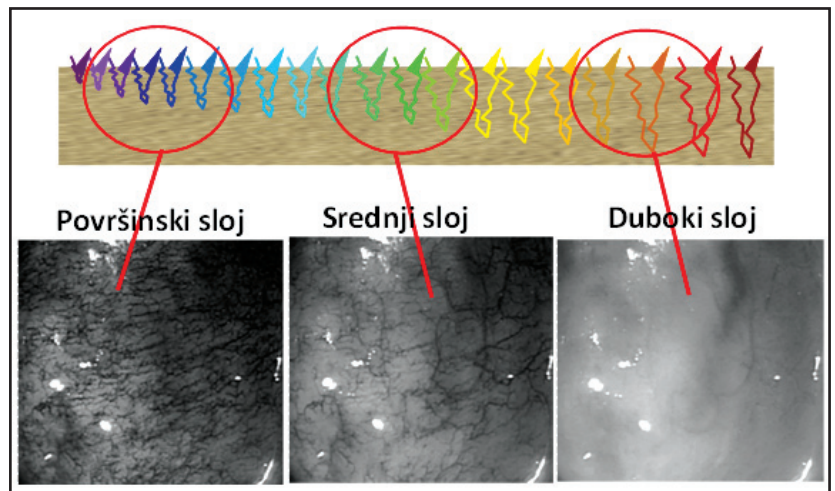


Slika 9. Karakteristični krvni sudovi koji se naglo završavaju, bifurkacija traheje, displazija trećeg stepena.

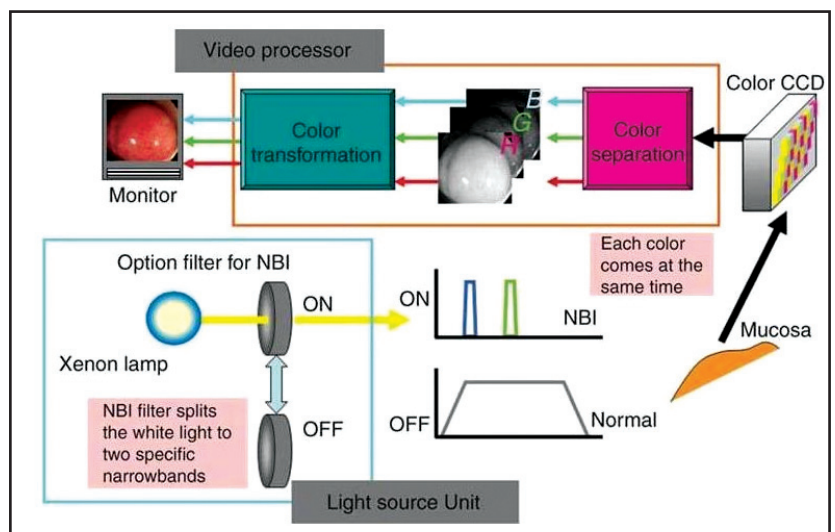
Dubina penetracije svetlosti



Slika 10. Sužavanjem spektra svetlosti postiže se različita penetracija snopova svetlosti u bronhijalnu sluznicu i bolja vizualizacija pojedinih kapilara.



Slika 11. Na slici je detaljnije prikazana zdrava vaskularna mreža krvnih sudova pojedinih slojeva sluznice bronha.



Slika 12. Šematski prikaz NBI sistema, klasa EVIS EXERA II.

i B kanale. Šematski prikaz NBI sistema, i stvaranja slike na monitoru prikazan je na slici 12. Da bi se postigla visoka vidljivost krvnih sudova, neophodno je da se površinski kapilari reprodukuju po crno-belom obrascu, a relativno deblji krvni sudovi u dubljim slojevima sluznice nekim drugim, uglavnom kolor obrascem. Sa druge strane, da bi ovakav sistem funkcionisao boje moraju biti locirane u delu spektra vidljivom za ljudsko oko. Upravo ovo je razlog zašto se svetlost talasne dužine 415 nm upućuje ka B i G kanalu – omogućujući prikaz površinske kapilarne mreže braon bojom. Svetlost talasne dužine 540 nm ide ka R-kanalu pa su zato kapilari smešteni dublje u sluznici često plavo-zelenkasti ili ljubičasti. Područja krvarenja, vizualizuju se crnom bojom, prosto zato što hemoglobin skoro u potpunosti apsorbira talasne dužine od 415 nm i 540 nm, pa uopšte nema refleksije svetlosti. Upravo zbog ovih, veoma značajnih tehnoloških unapređenja NBI je počela brzo da pronalazi svoje mesto u endoskopiji. Prve značajne studije sa upotrebom NBI u bronhijalnoj endoskopiji sproveo je Shibuya sa saradnicima, tokom 2002 i 2003 godine objavljene su dve takve studije u kojima se definisani vizuelno patološki obrasci, definisane prekanerozne lezije koje su najpogodnije za detekciju i određena specifičnost i senzitivnost ove tehnike u dijagnostici pre-malignih lezija. Visoka cena sistema, i ograničen broj edukovanih kadrova dugo su ograničavali dalje ispitivanje tehnologije. Tek posle 2005 godine, nakon dokazane uspešnosti u gastroskopiji, NBI jače ulazi u polje bronhoskopije. Tokom 2007 godine, Vincent objavljuje prvu prospektivnu kliničku studiju sa definisanjem lezija i dijagnostičkom tačnošću, a potom slede i druge studije sa širenjem ispitivanja efikasnosti NBI u pleurokopiji, proceni vaskularizacije grafta nakan transplantacije pluća i proceni ekstenzivnost endobronhijalnog tumora uz ispitivanje uticaja na terapijsku odluku (55-60).

Klinički značaj AFI i NBI videobronhoskopije

Velika većina do sada objavljenih studija koje su evaluirale dijagnosički značaj NBI ispitivala je ulogu ove tehnologije u detekciji pre-malignih lezija sluznice bronha i ranog stadijuma karcinoma bronha. U ovim studijama ustanovljeno je da NBI ima veliki značaj i da statistički značajno povećava specifičnost i senzitivnost detekcije pre-malignih lezija, u poređenju sa WLB. Ključne studije za uvođenje NBI videobronhoskopije u respiratornu endoskopiju objavljene su od strane Shibuya-e i saradnika 2001. i 2003. godine (17,23). U ovim studijama definisani su vizuelni patološki obrasci submukoznih krvnih sudova bronhijalne sluznice. Ovi tipovi patoloških obrazaca, kasnije poznati kao Shibuya deskriptori, definisani su kao tačkasti krvni sudovi, izvijugani krvni sudovi i krvni sudovi koji se naglo završavaju. U ovoj studiji autori su evaluirali ulogu NBI videobronhoskopije u detekciji angiogene skvamozne displazije, kao pre-maligne lezije sluznice bronha i skvamoznog karcinoma. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna korelacija između pojave tačka-

stih krvnih sudova i skvamoznog karcinoma bronha. U pilot studijama koje smo objavili 2009. godine (21,44), sa sličnim dizajnom kao i u poslednjoj našoj studiji (59) našli smo senzitivnost, specifičnost, PPV i NPV NBI videobronhoskopije 97.8%, 85%, 93.7% i 94.4%, respektivno. U pilot studiji evaluirali smo značajno manji broj bolesnika, svega 36. Grupa bolesnika u pilot studiji potpuno je demografski identična grupi bolesnika ispitivanih u ovoj studiji. Kod 14 bolesnika u pilot istraživanju NBI videobronhoskopija je pokazala veću ekstenziju endobronhijalnog tumora u poređenju NBI, a ovaj broj bolesnika je statistički značajan ($p=0.005$). Kod osam bolesnika ($p=0.001$) ovaj nalaz je doveo do promene u terapijskoj strategiji. Vrlo slične, u potpunosti komparabilne rezultate dobili smo u ovoj studiji, što potvrđuje značaj NBI videobronhoskopije. Senzitivnost, specifičnost PPV i NPV u doktorskoj studiji su 95%, 85.6%, 83.9% i 96%, respektivno. Veća ekstenzivnost procenjena NBI videobronhoskopijom i uticaj na odluku o terapiji potvrđeni su takođe kod statistički značajnog broja bolesnika. I rezultati dobijeni u komparativnom delu naše studije koji je evaluirao direktno odnos AFI, NBI i njihove kombinacije su uporedivi sa rezultatima pilot studije. U komparativnom delu senzitivnost, specifičnost, PPV i NPV NBI videobronhoskopije iznosile su 90.4%, 82.4%, 91.8%, i 79.7%, respektivno.

Kod 62 bolesnika Herth i saradnici (20) su evaluirali ulogu NBI videobronhoskopije u dijagnostici pre-malignih lezija i karcinoma in situ (CIS), u poređenju sa WLB videobronhoskopijom i AFI videobronhoskopijom. Senzitivnost NBI videobronhoskopije u dijagnostici CIS bila je 100% a u dijagnostici displazije 90%. Specifičnost NBI videobronhoskopije bila je 90% za obe indikacije; veća i od specifičnosti AFI, koja iznosila 52% za displaziju a 83% za CIS. Ako poredimo naše rezultate za NBI videobronhoskopiju u detekciji maligniteta, gde je nađena senzitivnost i specifičnost bila 95% i 85.6%, respektivno, možemo zaključiti da su naši rezultati konzistentni sa ovom studijom. Senzitivnost i specifičnost NBI u detekciji pre-malignih lezija u našoj studiji iznosila je 66% i 84.6%, što je slično sa rezultatima dobijenim u studiji koju je objavio Herth, i specifičnost AFI je u našoj studiji potpuno uporediva i iznosi 79.6% za sve lezije. Rezultati iz komparativnog dela naše studije koji se odnose na NBI pokazuju senzitivnost i specifičnost u detekciji margina maligniteta od 90.4% i 82.4% respektivno i takođe su konzistentni sa rezultatima koje su objavili Herth i saradnici. Razlike su delom u tehničkim karakteristikama opreme korištenim u ove dve studije, ali i pored toga te razlike nisu statistički značajne.

Jednu od najvećih studija koje su evaluirale dijagnostički značaj AFI, NBI i njihove kombinacije u odnosu na WLB u evaluaciji pre-malignih i malignih promena bronhijalne sluznice objavio je 2009. godine Herth sa saradnicima (33). U ovoj studiji senzitivnost i specifičnost WLB videobronhoskopije iznosile su 18% i 88%. Senzitivnost AFI, NBI i njihove kombinacije u dijagnostici ovih promena u Herth-ovoj studiji iznosila je 65%, 53% i 71%, respektivno. Kao i u kom-

parativnom delu naše studije i ovde je nađeno da je senzitivnost najveća ako se dve videobronhoskopije kombinuju. U našoj studiji senzitivnosti su veće u delu koji je evaluirao ekstenzivnost maligniteta, što je i za očekivati. U delu studije koji evaluira margine tumora senzitivnost je kod nas bila 95% za NBI videobronhoskopiju, senzitivnost AFI videobronhoskopije iznosila je 93% a kombinacije 93.7%, ovako više vrednosti su i očekivanje, jer u ovom delu naše studije u analizu nisu ušle pre-maligne lezije koje značajno snižavaju senzitivnost. Ako se osvrnemo na deo studije u kojem smo analizirali pre-maligne lezije, videćemo da su naši podaci u konzistenciji sa podacima iz Herth-ove studije, ovde je senzitivnost za pre-maligne lezije iznosila 26.5% za WLB videobronhoskopiju, 52% za AFI videobronhoskopiju, 66% za NBI i 86.1% za kombinaciju dve tehnike. Kada je specifičnost u detekciji pre-malignih lezija i tumora u pitanju, ona u Herth-ovoj studiji iznosi 88% za WLB videobronhoskopiju, 40% za AFI videobronhoskopiju, 90% za NBI i 40% za kombinaciju tehnika. Ovi su podaci takođe uporedivi sa podacima iz svih delova naše studije. Kod nas specifičnost NBI iznosi 85.6%, specifičnost AFI videobronhoskopije je 79% dok je specifičnost kombinacije 86.9%. I u ovom delu veća specifičnost nekih tehnika kod nas uzrokovana je činjenicom da je u analizu uključena samo evaluacija margina malignog tumora. Kada pogledamo specifičnosti pojedinih tehnika u detekciji pre-malignih lezija, rezultati su jednako uporedivi sa rezultatima Hajdelberške grupe. U ovom delu naše studije specifičnost WLB je 63.9%, AFI 79.6%, NBI 84.6% i kombinacije 86.8%. Iz svega navedenog vidi se da su naši podaci uporedivi sa Herth-ovim i da se obe studije završavaju sa istim zaključkom, obe tehnike videobronhoskopije pokazuju superiornost u odnosu WLB u detekciji pre-malignih lezija i karcinoma bronha, a NBI pokazuje veću specifičnost i senzitivnost i od WLB i od AFI videobronhoskopije.

Dve meta-analize (36,37) koje su evaluirale ulogu autofluorescentne videobronhoskopije u detekciji pre-malignih i malignih lezija bronhijalne sluznice objavljene su sredinom 2011. godine. U obe meta-analize citirane su studije našeg istraživačkog tima, što ukazuje na njihov doprinos ovoj temi. Sun i saradnici (37) uradili su meta-analizu sa ciljem komparacije tačnosti autofluorescentne bronhoskopije u kombinaciji sa konvencionalnom videobronhoskopijom u poređenju sa konvencionalnom videobronhoskopijom samom, u detekciji pre-malignih lezija i karcinoma bronha. Pretražene su baze Ovid, PubMed i Google Scholar i to u preiodu januar 1990 do oktobar 2010. Od preko 300 studija, sa adekvatnim podacima nađena je 21 studija sa ukupno 3266 bolesnika. Ukupna senzitivnost autofluorescentne videobronhoskopije u detekciji pre malignih lezija u ovoj meta analizi bila je 84.63%, a senzitivnost konvencionalne videobronhoskopije uskog snopa svetlosti 42.54%. Naši rezultati koji se odnose na pre-maligne lezije pokazali su senzitivnost AFI of 52% a konvencionalne bronhoskopije 26.5%, vrednosti su nešto niže nego u meta analizi, uglavnom zbog tehničkih

karakteristika i heterogenosti sistema analiziranih u meta-analizi, ali i zbog činjenice da je u meta analizi evaluirana i efikasnost u detekciji pre-malignih lezija. Zato su rezultati iz dela naše studije koji su evaluirali senzitivnost i specifičnost AFI u proceni ekstenzivnosti endobronhijalnog tumora više komparabilni sa rezultatima meta-analize. U našoj studiji senzitivnost AFI videobronhoskopije bila je 93%, a specifičnost 92%, što je komparabilno sa rezultatima meta-analize. Senzitivnost WLB videobronhoskopije bila je 84% a specifičnost 79%. Senzitivnost u detekciji karcinoma bronha izračunata u meta analizi za autofluorescentnu videobronhoskopiju iznosi 94.71%, u našoj studiji je 93%, dok je senzitivnost WLB 88.53% u meta analizi a u našoj studiji 84%. Ovi rezultati, koji se mogu porediti sa rezultatima Sun-ove meta-analize potvrđuju tačnost hipoteza postavljenih u našoj studiji. Sun u zaključku svoje meta-analize navodi da autofluorescentna videobronhoskopija statistički značajno povećava senzitivnost u detekciji i pre-malignih lezija i karcinoma bronha. U meta-analizi koju su objavili Chen i saradnici (36) takođe je evaluirana uloga autofluorescentne videobronhoskopije u dijagnostici pre-malignih i malignih lezija sluznice bronha. Činjenica da se u svim studijama navodi kombinacija autofluorescentne bronhoskopije i konvencionalne bronhoskopije, nasuprot konvencionalnoj bronhoskopiji posledica je dizajna tehnologije i didaktički je tačna. Zapravo se uvek kada se evaluira dijagnostički značaj autofluorescentne videobronhoskopije evaluira njena kontribucija konvencionalnoj bronhoskopiji u odnosu na samu konvencionalnu bronhoskopiju. Nedostatak obe ove meta-analize je zajednička senzitivnost i specifičnost klasičnih (starih) sistema autofluorescentne (fiber-optičke) fleksibilne bronhoskopije i novih videobronhoskopskih sistema. Iako je princip tehnologije isti, videobronhoskopski sistemi, kakav je i AFI videobronhoskopija, imaju znatno bolje rezultate, čija se vrednost u ovakvim meta-analizama u stvari matematički i artefijelno smanjuje. Bez obzira na sve, Chan-ova meta analiza jedna je od najznačajnijih studija o autofluorescentnoj bronhoskopiji objavljena do sada. U cilju pronalaženja adekvatnih studija, autori su pretražili dve najveće baze podataka MEDLINE i EMBA-SE, zaključno sa junom 2009 godine. U ovoj meta analizi citirani su rezultati naše pilot studije objavljene ranije te godine. Od 439 publikacija, 14 studija je zadovoljilo kriterijume meta-analize, obezbedivši 15 setova podataka. Obzirom na već pomenute razlike u tehničkim karakteristikama sistema pre svega, razlike u izvoru bele monohromatske svetlosti, u histološkim kriterijumima i strategiji biopriranja u ovoj meta-analizi nisu razmatrani. Ukupna senzitivnost i specifičnost autofluorescentne bronhoskopije u Chen-ovoj analizi je 90% (95% CI, 0.84 – 0.93) i 56% (95% CI, 0.45 – 0.66). Podaci Chen-ove meta analize su uporedivi sa podacima dobijenim u našoj studiji gde je senzitivnost 93% a specifičnost 92%, još bolje koreliraju rezultati senzitivnosti i specifičnosti nađeni u komparativnom delu naše studije gde je senzitivnost bila 89.1% a specifičnost 77.8%. Razlike koje postoje, rezultat

su pre svega tehničkih karakteristika. Kada je u pitanju senzitivnost i specifičnost WLB, one u meta analizi iznose 66% i 69% i u potpunosti koreliraju sa rezultatima u našoj studiji gde je WLB pokazala senzitivnost 84% i specifičnost 79%, tj. u komparativnom delu studije 76.8% i 51.9%. I ova meta-analiza govori u prilog potvrde hipoteza našeg istraživanja, koje pretpostavljaju značajnu ulogu AFI u detekciji i pre-malignih i malignih lezija sluznice bronha.

Literatura

1. Wahidi MM, Herth FJF, Ernst A. State of the art: Interventional Pulmonology. *Chest* 2007; 131: 261-274.
2. Wisnivesky JP, Yung RC, Mathur PN, Zulueta JJ. Diagnosis and treatment of bronchial intraepithelial neoplasia and early lung cancer of the central airways: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl): e263S-77S.
3. Colt HG, Murgu SD. Interventional bronchoscopy from bench to bedside: new techniques for early lung cancer detection. *Clin Chest Med* 2010; 31(1):29-37.
4. Perin B, Zarić B, Becker HD. Interventional Pulmonology. In Jeremic B (Eds): *Medical Radiology*, 2011, *Advances in Radiation Oncology in Lung Cancer*, Springer Verlag, Heidelberg 2011, pp 45-52.
5. Yarmus L, Feller-Kopman D. Bronchoscopes of the twenty-first century. *Clin Chest Med* 2010; 31(1): 19-27.
6. Zarić B, Stojšić V, Sarcev T, Stojanović G, Carapic V, Perin B. et al. Advanced bronchoscopic techniques in diagnosis and staging of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.05.15; *in press*
7. Zarić B, Perin B, Becker HD, Herth FJF, Eberhardt R, Djurić M, Djurić D, Matijasević J, Kopitović I, Stanic J. Autofluorescence imaging (AFI) videobronchoscopy in detection of lung cancer: from research tool to everyday procedure. *Expert Rev Med Devices* 2011; 8 (2): 167-172.
8. Zarić B, Perin B, Carapic V, Stojšić V, Matijasević J, Andrijević I, Kopitović I. Diagnostic value of autofluorescence bronchoscopy in lung cancer. *Thorac Cancer*. 2013; 4 (1): 1-8.
9. Bolliger CT, Mathur PN, Beamis JF et al. ERS/ATS statement on interventional pulmonology. European Respiratory Society/American Thoracic Society. *Eur Respir J* 2002; 19(2): 356-373.
10. Lam S, Kennedy T, Unger M, et al. Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 1998; 113: 696-702.
11. Lee P, Brokx HAP, Postmus PE, Sutedja TG. Dual digital video-auto fluorescence imaging for detection of pre-neoplastic lesions. *Lung Cancer* 2007; 58: 44-49.
12. Loewen G, Natarajan N, Tan D, et al. Autofluorescence bronchoscopy for lung cancer surveillance based on risk assessment. *Thorax* 2007; 62: 335-340.
13. Herth FJF, Ernst A, Becker HD. Autofluorescence bronchoscopy – a comparison of two systems (LIFE and D-Light). *Respiration* 2003; 70: 395-398.
14. Ikeda N, Honda H, Hayashi A, Usuda J, Kato Y, Tsuboi M et al. Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopy-based autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer* 2006;52:21-27.
15. McWilliams A, Lam B, Sutedja T. Early proximal lung cancer diagnosis and treatment. *Eur Respir J* 2009; 33: 656-665.
16. Rosell A, Sutedja TG. Early detection of lung cancer. *Eur Respir Mon* 2010; 48: 35-44.
17. Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H et al. Fluorescence bronchoscopy in the detection of preinvasive lesions in patients with sputum cytology suspicious or positive for malignancy. *Lung Cancer* 2001; 32: 19-25.
18. Moro-Sibilot D, Jeanmart M, Lantuejoul S et al. Cigarette smoking, preinvasive bronchial lesions, and autofluorescence bronchoscopy. *Chest* 2002; 122: 1902-1908.
19. Lee P, de Bree R, Brokx HAP, Leemans CR, Postmus PE, Sutedja TG. Primary lung cancer after treatment of head and neck cancer without lymph node metastasis: is there a role for autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer* 2008; 62(3): 309-315.
20. Herth F. Playing with the wavelengths: Endoscopic early lung cancer detection. *Lung Cancer* 2010; 69(2): 131-132.
21. Zarić B, Perin B, Joveljic A, et al. Influence of Narrow Band Imaging (NBI) Videobronchoscopy on the Assessment of Central Lung Cancer Extension and Therapeutic Decision. *Cancer Invest* 2009; 27: 918-923.
22. Zarić B, Becker HD, Perin B, et al. Narrow Band Imaging (NBI) videobronchoscopy improves assessment of lung cancer extension and influences therapeutic strategy. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39: 657-663.
23. Zarić B, Perin B. The use of narrow band imaging bronchoscopy in detection of lung cancer. *Expert Rev Med Devices* 2010; 7(3): 395-406.
24. Chiyo M, Shibuya K, Hoshino H, et al. Effective detection of bronchial preinvasive lesions by a new autofluorescence imaging bronchovideoscope system. *Lung Cancer* 2005; 48: 307-313.
25. Häussinger K, Becker HD, Stanzel F, et al. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a European randomized controlled multicenter trial. *Thorax* 2005; 60: 496-503.
26. Ueno K, Kusunoki Y, Imamura F, et al. Clinical experience with autofluorescence imaging system in pa-

- tients with lung cancers and precancerous lesions. *Respiration* 2007; 74: 304-308.
27. Chhajed PN, Shibuya K, Hoshino H, et al. A comparison of video and autofluorescence bronchoscopy in patients at high risk of lung cancer. *Eur Respir J* 2005; 25: 951-955.
 28. Lam B, Wong MP, Fung SL, Lam DCL, Wong PC et al. The clinical value of autofluorescence bronchoscopy for the diagnosis of lung cancer. *Eur Respir J* 2006; 28: 916-919.
 29. Stringer MR, Moghissi K, Dixon K. Autofluorescence bronchoscopy in volunteer asymptomatic smokers. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008; 5: 148-152.
 30. Hanibuchi M, Yano S, Nishioka Y, Miyoshi T, Kondo K, Uehara H, Sone S. Autofluorescence bronchoscopy, a novel modality for the early detection of bronchial premalignant and malignant lesions. *J Med Invest* 2007; 54: 261-266.
 31. Beamis JF, Ernst A, Simoff M, Yung R, Mathur P. A multicenter study comparing autofluorescence bronchoscopy to white light bronchoscopy using a non laser light stimulation system. *Chest* 2004; 125: 148-149.
 32. Ernst A, Simoff MJ, Mathur PN, Yung RC, Beamis Jr JF. D-light autofluorescence in the detection of premalignant airway changes: a multicenter trial. *J Bronchol* 2005; 12: 133-138.
 33. Herth FJF, Eberhardt R, Anantham D, Gompelmann D, Zakaria MW, Ernst A. Narrow-band imaging bronchoscopy increases the specificity of bronchoscopic early lung cancer detection. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 1060-1065.
 34. Hirsch FR, Prindiville SA, Miller YE et al. Fluorescence versus white light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1385-1391.
 35. Edell E, Lam S, Pass H et al. Detection and localization of intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma using fluorescence-reflectance bronchoscopy: an international, multicenter clinical trial. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 49-54.
 36. Chen W, Gao X, Tian Q, Chen L. A comparison of autofluorescence bronchoscopy and white light bronchoscopy in detection of lung cancer and preneoplastic lesions: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2011; 73(2): 183-188.
 37. Sun J, Garfield DH, Lam B, Yan J, Gu A, Shen J, Han B. The value of autofluorescence bronchoscopy combined with white light bronchoscopy compared with white light alone in the diagnosis of intraepithelial neoplasia and invasive lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Oncol*. 2011; 6(8): 1336-44.
 38. MacEachern P, Tremblay A. Improving specificity of autofluorescence bronchoscopy. *J Bronchol Interv Pulmonol* 2009; 16(3): 155-156.
 39. Cetti EJ, Nicholson AG, Singh S, Wells AU, Shah PL. An evaluation of a videobronchoscopy-based autofluorescence system in lung cancer. *Eur Respir J*. 2010; 35(5): 1185-1187.
 40. Pierard P, Faber J, Hutsebaut J, Martin B, Plat G, Sculier JP, Ninane V. Synchronous lesions detected by autofluorescence bronchoscopy in patients with high-grade preinvasive lesions and occult invasive squamous cell carcinoma of the proximal airways. *Lung Cancer* 2004; 46: 341-347.
 41. van Rens M.Th M, Schramel FMNH, Elbres JRJ, Lammers JWJ. The clinical value of lung imaging fluorescence endoscopy for detecting synchronous lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32: 13-18.
 42. Weigel TL, Yousem S, Dacic S, Kosco PJ, Siegfried J, Luketich JD. Fluorescence bronchoscopic surveillance after curative surgical resection for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Surg* 2000; 7 (3): 176-180
 43. Tsunazuka Y, Oda M, Ohta Y, Matsumoto I, Tamura M, Watanabe G. Fluorescence bronchoscopy for selection of surgical procedure in patients with early staged endobronchial carcinoma. *Artif Organs* 2005; 29 (4): 348-352.
 44. Zaric B, Canak V, Stojanovic G, et al. Autofluorescence videobronchoscopy (AFI) for the assessment of tumor extension in lung cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2009; 8(1): 79-84.
 45. Zaric B, Becker HD, Perin B, et al. Autofluorescence Imaging Videobronchoscopy Improves Assessment of Tumor Margins and Affects Therapeutic Strategy in Central Lung Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40: 139-145.
 46. Zaric B, Perin B, Becker HD, Herth FJ, Eberhardt R, Jovanovic S, Orlic T, Panjkovic M, Zvezdin B, Jovelic A, Bijelovic M, Jurisic V, Antonic M. Combination of narrow band imaging (NBI) and autofluorescence imaging (AFI) videobronchoscopy in endoscopic assessment of lung cancer extension. *Med Oncol*. 2012; 29(3):1638-1642.
 47. Uehlinger P, Gabrecht T, Glanzmann T. In vivo time-resolved spectroscopy of the human bronchial early cancer autofluorescence. *J Biomed Opt* 2009; 14(2), 024011.
 48. Hüttenberger D, Gabrecht T, Wagnières G. Autofluorescence detection of tumors in the human lung--spectroscopical measurements in situ, in an in vivo model and in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008; 5(2): 139-147.
 49. Gabrecht T, Glanzmann T, Freitag L, Weber BC, van den Bergh H, Wagnières G. Optimized autofluorescence bronchoscopy using additional backscattered red light. *J Biomed Opt* 2007; 12(6): 064016.

RECIST KRITERIJUMI - JUČE, DANAS, SUTRA.

RECIST CRITERIA - PAST, PRESENT, FUTURE.

Stojanović Miloš, Vujasinović Gordana, Dragišić Dragan, Pena Karan Slobodanka

Korespondencija:
Dr sc. med. Miloš Stojanović
CENTAR ZA RADIOLOGIJU

Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica
Put doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, ipbvojvodine@gmail.com

Pneumon 2013; 50:67-71

SAŽETAK

Od kada su se pojavili u kliničkoj praksi, upotreba RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) kriterijuma beleži stalni rast. Uporedo s tim raste broj publikovanih članaka koji obrađuju ovu temu, što oslikava značaj ovog pitanja za širu medicinsku javnost. Ništa manje nije ni interesovanje lekara različitih specijalnosti u pogledu RECIST kriterijuma, koje se ispoljava u svakodnevnoj komunikaciji (na zajedničkim sastancima). Osnove RECIST kriterijuma su sadržane u principima merljivosti i broja lezija, kao i u izračunavanju zbira dijametara odabranih ciljnih („target“) lezija. Međutim, iz tih principa proističe i najveći broj dilema prilikom korišćenja RECIST sistema. Iako široko eksploatisani, RECIST kriterijumi su daleko od idealnih. Stoga se sa pravom očekuju dalja poboljšanja i revizije (prva revizija je bila 2009. godine), kako bi se postigao što realniji uvid u delovanje primenjene terapije na maligno oboljenje.

SUMMARY

Ever since they were first published, the use of RECIST criteria (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) in clinical practice has continued to grow. At the same time, there is a growing number of articles dealing with this topic, which reflects an important role of this issue for the general medical public. Physicians of various specialties have shown interest in RECIST criteria on a daily basis (during the joint meetings). Baseline for RECIST criteria is represented by the principle of a measurable disease – measuring dimensions and number of lesions and calculating the total sum of the “target” lesions longest diameter. However, there are many dilemmas related to the use of RECIST criteria which result from these very principles. Despite the fact that they are widely used, RECIST criteria are far from ideal. In conclusion, we eagerly expect further improvements and revisions (first revision was in 2009), in order to achieve a more realistic insight into the actual effects of specific treatments on a malignant disease.

Nastanak RECIST kriterijuma

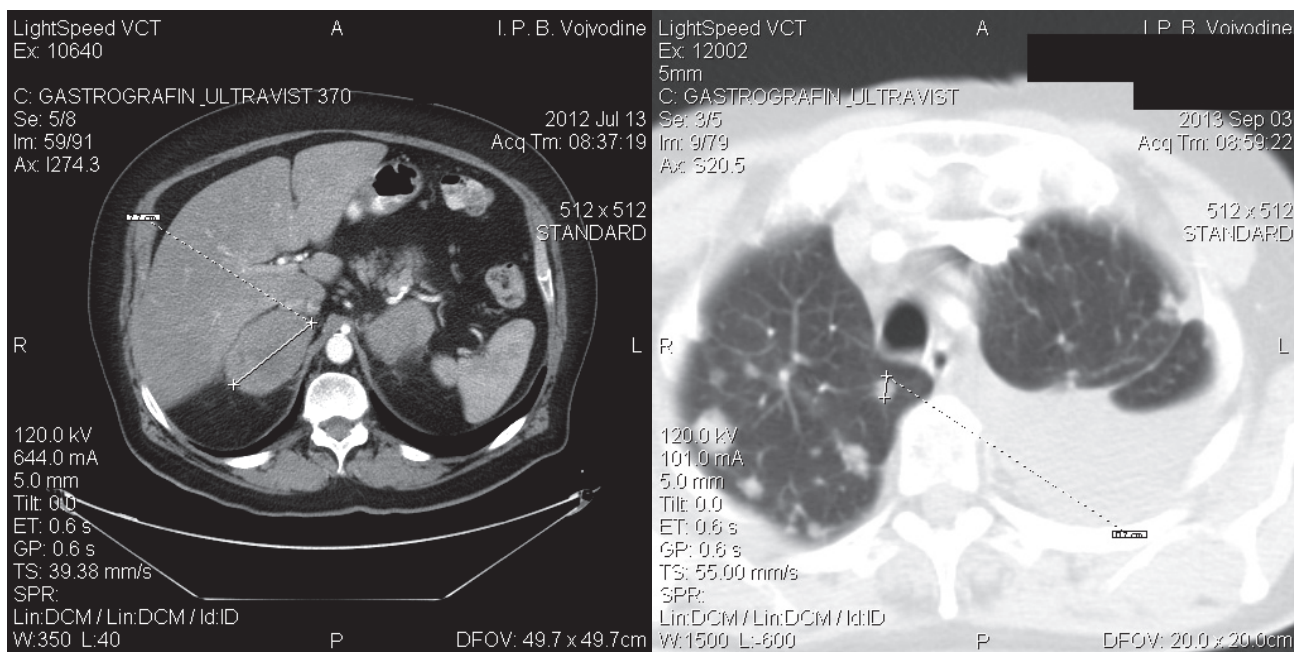
Kontinuiran porast obima posla u onkologiji doveo je do potrebe da se komunikacija radiologa sa onkologom postavi na nove osnove. U svakodnevnom radu sa onkološkim pacijentima lekari odlučuju o započinjanju, menjanju, nastavku ili o obustavljanju terapije malignog oboljenja. Pri tome u nizu medicinskih podataka koji se uzimaju u obzir, i na osnovu kojih se donose odluke, radiološki pregled zauzima centralno mesto. Nakon započinjanja medikamentozne terapije, osnovni interes onkologa je „dinamika radiološke slike“, što je u stvari odgovor na pitanje da li je radiološka slika nepromenjena, poboljšana (delimično ili u potpunosti) ili je pogoršana. Stoga je i izneseno mišljenje radiologa davalo najviše dijagnostički korisnih informacija, ukoliko se podudaralo sa navedenom sistematikom.

Prvi napori za kreiranje standardizovanih protokola kojima bi se utvrđivali efekti terapije na maligna obolje-

nja, vrše *Moertel and Hanley* pod okriljem Svetske zdravstvene organizacije, 70tih godina 20og veka (1). Autori su tada tragali za pogodnim matematičkim modelima, koji bi omogućili izračunavanja volumena tumorske mase, i samim tim omogućili poređenje stanja sa prethodnim pregledom. Takođe su težili da se postigne smanjenje greške zbog različitih interpretatora. Uloženi naponi su rezultirali u komplikovanim metodama diskutabilne tačnosti, koje nisu zaživele u svakodnevnoj praksi.

- Zajedničkim radom nekoliko eminentnih udruženja iz oblasti onkologije:
- European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC),
- US National Cancer Institute
- National Cancer Institute of Canada

donelo je 2000. godine prvu verziju RECIST protokola (poznatu pod oznakom 1.0). Tada su uspostavljena osnovna pravila kojima se lekari služe i sada, nakon što je izvršena



Slika 1: Prikaz „target“ i „non target“ lezija.

prva revizija kriterijuma (2009). Najvažnije osobine RECIST kriterijuma su bile:

- Merljivost lezija (do 10mm „non target“, preko 10mm „target“)
- Brojnost lezija (ukupno 5 lezija, 5 po pojedinačnom organu)
- Praćenje jednog (najdužeg) dijametra, u odnosu na bidimenzionalna merenja

Po objavljivanju RECIST 1.0 brojne ustanove, istraživači, interesne grupe, ali i agencije vladinog sektora su prihvatili pomenuta pravila i integrisala ih u svoj rad. Do prekretnice u značaju RECIST –a dolazi onda kada su pomenute protokole zakonski odobrile medicinske agencije razvijenih zemalja.

Pošto se radi o kriterijumima koji se odnose na solidne tumore, sva uputstva se odnose isključivo na tumore mekotkivne građe. RECIST kriterijumi su namenjeni praćenju efekata primenjene terapije. Kako se najčešće radi o lečenju citostaticima, medikamentozna onkologija je oblast medicine u kojoj se RECIST kriterijumi najviše primenjuju.

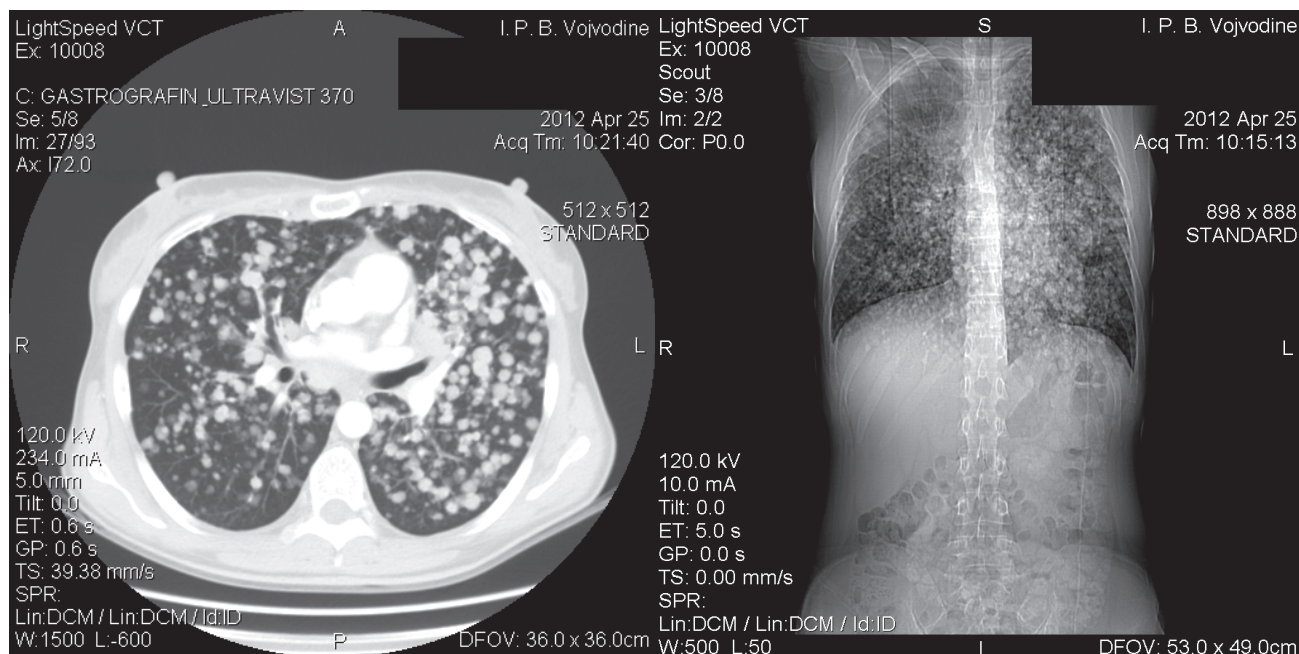
Korišćenje RECIST kriterijuma.

Razlikuju se patološke promene koje podležu sistemu praćenja i one koje nisu pogodne za analizu. Prve se nazivaju merljivim, a druge nemerljivim, iako takva nomenklatura nije u potpunosti ispravna. Naime, mogućnost merenja dijametra nije jedini kriterijum koji određuje da li će neka lezija biti predmet kontrole u nizu pregleda. Suštinski gledano, RECIST kriterijumi su ustanovljeni da bi se primenjivali na patološke lezije koje su u direktnoj vezi sa malignim oboljenjem, tj predstavljaju ili primarnu tumorsku masu, ili sekundarne depozite osnovnog oboljenja. Stoga se patološke promene nemaligne etiologije isključuju iz razmatranja (npr: konsolidacija parenhima pluća, inflamatorne lezije pluća ili drugih organa, fibrozne promene, cistične lezije, kalcifikacije, absces mozga itd.). Takođe su iz analize izuzete i maligne promene kojima se ne mogu utvrditi dimenzije (maligne lezije koje se prezentuju kao mrljasta područja denziteta mlečnog stakla u parenhimu pluća, permeantni sekundarni depoziti kostiju ili jetre itd).

Tabela 1: Praćenje efekata terapije prema RECIST kriterijumima.

TARGET lezije	NON TARGET lezije	Novonastale promene	Krajnji rezultat
PR	PR	ne	PR
PR	Ni PB, ni PB	En	DR
PR	Nije uočeno	Ne	DR
DR	Nije uočeno, bez PB	Ne	DR
SB	Nije uočeno, bez PB	Ne	SB
PB	Bilo koji ishod	Da ili ne	PB
Bilo koji ishod	PB	Da ili ne	PB
Bilo koji ishod	Bilo koji ishod	da	PB

PR- kompletna regresija, DR- delimična regresija, SB – stabilna bolest, PB-progresivna bolest.



Slika 2: Mnoštvo bilateralnih pulmonalnih lezija.

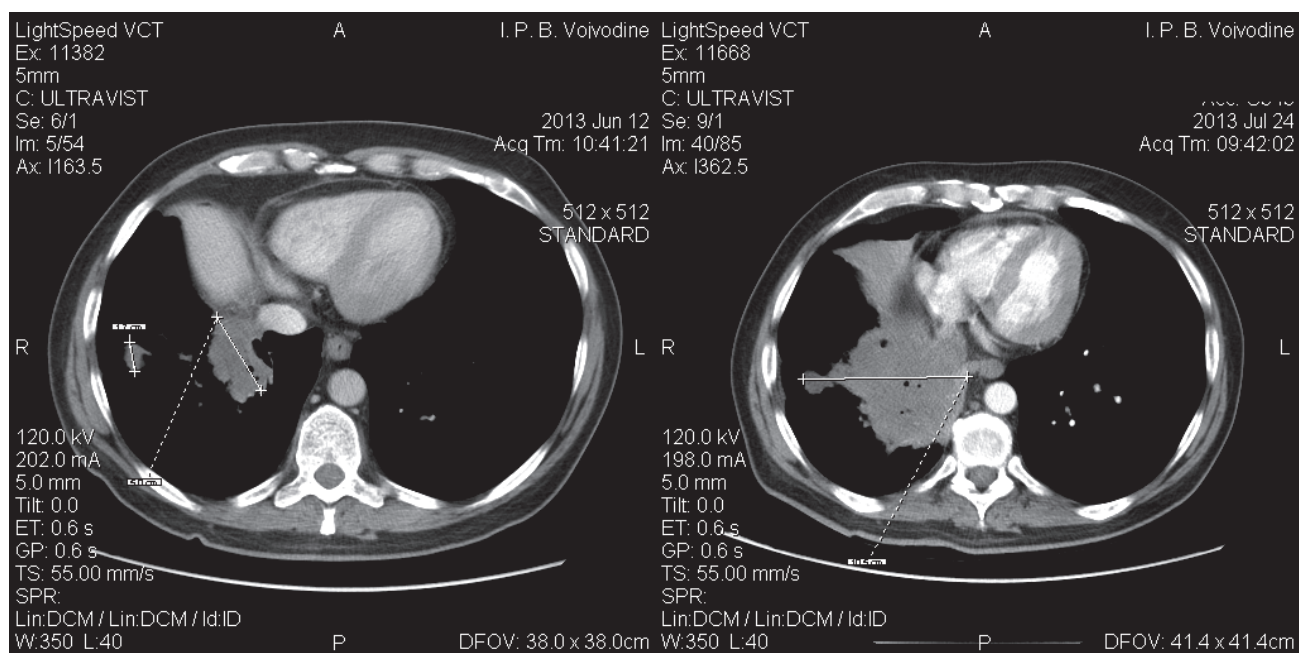
Merljive lezije su klasifikovane u grupu „target“ i „non target“. Određuje se najviše 5 „target“ promena (ne više od dve po organu), čiji zbir dijametara daje početnu, bazičnu vrednost. Takođe se na prvom pregledu određuju „non target“ lezije koje se nadalje prate (slika 1).

Na kontrolnim pregledima se utvrđuje da li je došlo do pojave novih merljivih lezija, što je znak da je došlo do progresije. Povećanje zbira dijametara „target“ lezija 20% takođe implicira progresiju. Kriterijum za parcijalnu regresiju je smanjenje zbira dijametara 30% ili više (Tabela 1) Varijacije zbira dijametara u rasponu navedenih dvaju graničnih vrednosti se smatraju stanjem bez značajnijeg odstupanja,

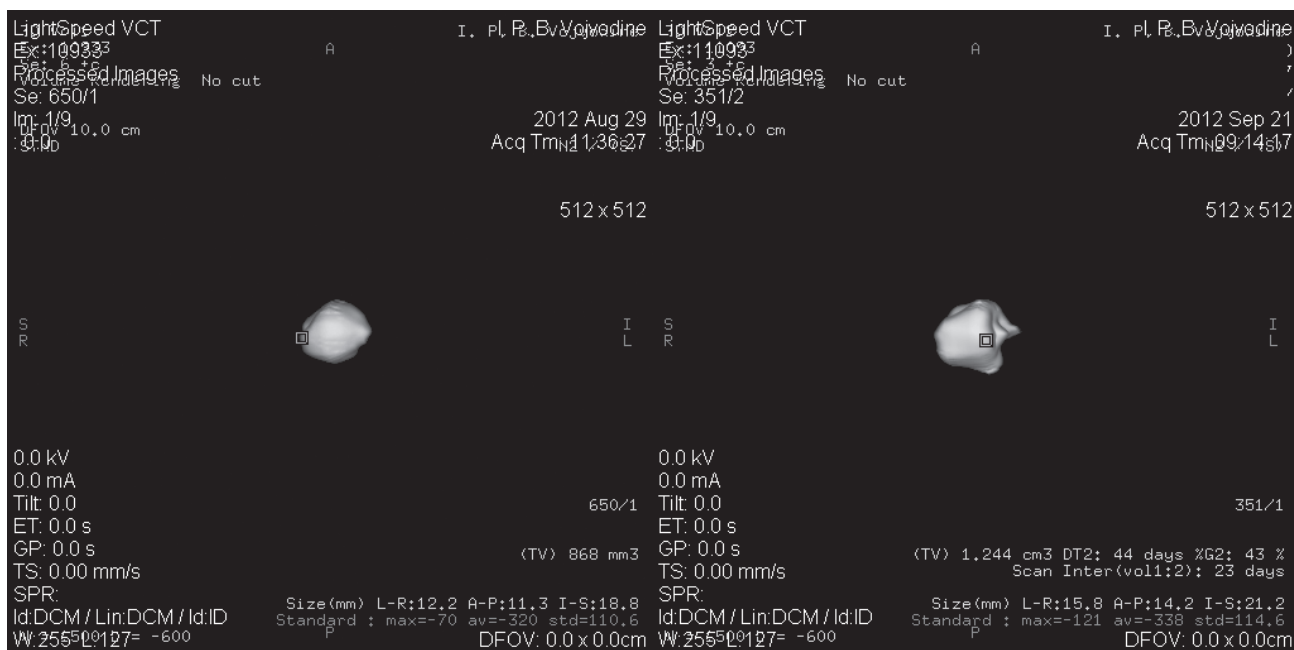
što se označava kao stabilna bolest. Potpuna regresija podrazumeva da se na kontrolnom pregledu ne detektuju ranije zabeležene „target“, „non target“ niti novonastale merljive lezije, i predstavlja više teoretski pojam, nego ishod lečenja u praksi (2).

Nedostaci RECIST sistema i nedoumice u praksi.

Najčešće se u praksi primećuju slabosti RECIST sistema kod bolesnika kod kojih je maligna bolest raširena u formi brojnih sekundarnih depozita. Tada se, pre svega, sa poteškoćama može pratiti brojno stanje mekotkivnih lezija



Slika 3: „Spajanje“ dve lezije.



Slika 4: Volumetrija odabranog pulmonalnog nodulusa.

parenhimskih organa, ili uvećanih limfnih čvorova. Za izbor dve lezije iz mnoštva promena u određenom organu ne postoje posebne instrukcije, što ostavlja „prostor“ za subjektivno delovanje istraživača (slika 3). Zamena lezija tokom višekratnih kontrolnih pregleda je greška na koju treba unapred računati, te se stoga radiolog treba osigurati da do nje ne dođe, ukoliko na prvom pregledu primeći pretpostavke za takvu mogućnost (npr veliki broj promena, lezije slične pozicije i morfoloških osobina...). Beleženje dodatnih podataka, kao što su broj serije i snimka na kome se lezija vidi, smanjuje rizik od pojave takvih grešaka.

Pojedini nedostaci RECIST sistema se ispoljavaju kada su dese promene na konkretnoj merljivoj leziji. Usled smanjenja veličine lezija može da se „podeli“ na dve. Nadalje, kroz izvesno vreme može doći do konfluiranja, tj spajanja dve ili više susednih lezija u jednu (slika 4). Iako je takav ishod predviđen, i propisana su metodološka uputstva za takav „scenario“, brojni autori ukazuju na slabost RECIST kriterijuma u tom slučaju. Moguće je da kasnije dođe do „razdvajanja“ prethodno spojenih lezija, pa i čak da se proces ponovi nekoliko puta?

Na ovom mestu treba napomenuti da su izvesni početni nedostaci RECIST sistema otklonjeni prvom revizijom. To se prvenstveno odnosi na limfne čvorove, za koje su zadate posebne merne vrednosti (do 10mm se ne smatraju patološkim, od 10mm do 15mm „non target“, preko 15mm „target“ lezije), i pravila merenja (po kraćoj osovini elipsoida). Istom revizijom su otklonjene dileme vezane za infiltrativne lezije kostiju. Klasifikovanje koštanih promena zavisi od toga da li se u okviru istih izdvaja merljiva mekotivna masa ili ne. Takvo uputstvo predstavlja pomak u dobrom pravcu, ako se zna da su pre revizije sve koštane lezije, bez obzira na prirodu, bile izuzete iz RECIST kriterijuma.

Kakva je budućnost RECIST- kriterijuma?

Iako široko eksploatisani, RECIST kriterijumi su daleko od idealnih. Rezultat pregleda i načinjenih merenja dobijen primenom postupaka aproksimacije nije uvek u stanju da verno odrazi stvarno stanje malignog oboljenja. Radna grupa koja je bila angažovana za reviziju RECIST kriterijuma pod oznakom 1.0, pored dopune postojećih pravila, dala je i smernice budućeg razvoja. Te smernice se, u najkraćem, mogu svesti na traganje za mogućnostima prevazilaženja anatomskog, jednodimenzionalnog merenja u svrhu procene reakcije tumorske mase na primenjenu terapiju. Naime, jednodimenzionalno merenje nije prikladno ni za procenu zapremine tumorske mase, a još manje oslikava stvarno stanje „odgovora“ na primenjenu terapiju. Iznose se dve pretpostavke koje bi, u dogledno vreme, mogle da poboljšaju verodostojnost zaključka kontrolnog pregleda. Prva mogućnost leži u korišćenju volumetrije, u svrhu preciznijeg merenja zapremine mekotivne tumorske mase. Brojni proizvođači radiološke opreme odavno su uveli, i, u kontinuitetu razvijaju volumetrijske softverske pakete. Automatski, ručno ili u kombinaciji (poluautomatski) se označi region od interesa, koji predstavlja sliku tumorske mase u prostoru. Kompjuterskim programom se izračuna zapremina svakog geometrijskog oblika. Kada se, prilikom sledećeg (kontrolnog) pregleda, dobije novi rezultat, vrši se poređenje prvobitne i sledeće izračunate zapremine tumora (3). Dobijena razlika se izražava u apsolutnoj vrednosti i procentualno (Slika 5). Takođe se uzima u obzir vreme proteklo između dva pregleda. Kao dodatni medicinski dijagnostički podatak, dobija se i vreme udvostručavanja tumora – TDT (tumor duplication time). Nažalost, perspektiva razvoja volumetrije, pa samim tim i njene upotrebe u RECIST postupku je, prema pojedinim istraživačima, ne-

izvesna. Nedavno je u autorskom članku izneta tvrdnja da je sadašnjost volumetrije „zarobljena“ u svojevrsnom „začaranom krugu“. S jedne strane sama metoda nije masovno uvedena u kliničku praksu, ponajviše zbog toga što nije standardizovana, već se njenim razvojem bave pojedinačne interesne grupe zasebno. (Narano svaka od njih tvrdi da je baš njihova metoda najsigurnija). S druge strane, nije ni moguće postaviti tehnološke standarde metode o čijoj kliničkoj iskoristljivosti (upotrebi) nema dovoljno povratnih informacija (4). U zavisnosti od uspeha rešenja ove paradigme, mogu se i očekivati realne koristi u smislu poboljšanja postojećeg sistema.

Druga mogućnost je upotreba metoda koje izlaze iz okvira „suve morfologije“, tj. metoda koje su funkcionalne ili morfo-funkcionalne po svojoj prirodi. U tom slučaju bi se kvantifikovale, ne samo veličina (prečnik odnosno zapremina) već i biološka vrednost (stepen metaboličkih aktivnosti, funkcionalni status) posmatranog tumorskog tkiva. Aktuelno se razmatra mesto PET-CT i PET-MRI hibridnih tehnika pregleda. Nakon više godina kliničke verifikacije, PET-CT je etablirana metoda pouzdanog morfološkog, ali i funkcionalnog prikaza tumorskih lezija.

Bez obzira na različite mogućnosti koje se predviđaju, u jedno možemo da budemo sigurni: RECIST kriterijumi su već sada nezamenjiv deo svakodnevne radiološke i onkološke prakse. Možemo očekivati da će naponi uloženi u upotpunjavanje kriterijuma dati rezultat i omogućiti još preciznije praćenje tumorskih lezija u vremenskom intervalu kontrole.

Literatura

1. Moertel CG, Hanley JA. The effect of measuring error on the results of therapeutic trials in advanced cancer. *Cancer*. 1976;38:388-94.
2. Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1 (RECIST 1.1). [pristupljeno 03.09.2009.]. Dostupno na <http://www.recist.com/recist-in-practice/01.html>.
3. Webb WR, Higgins BC. Thoracic imaging pulmonary and cardiovascular radiology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
4. Freiherr G. The development of quantitative imaging: caught in a vicious circle. *Diagn Imaging Eur*. 2013; 5:18-21.

IN MEMORIAM

ĐORĐE TABORI 1929-2013



Profesor dr Đorđe Tabori rođen je 12. 02. 1929. godine u Somboru, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 1954. godine. Po završetku studija obavljao je lekarski staž na klinikama Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Počeo je da radi 1956. godine u Hiruškoj ambulanti, kasnije kao lekar opšte medicine i kao lekar na Internom odeljenju Opšte bolnice u Somboru. Državni ispit položio je 1958. godine, a specijalistički ispit iz ftiziologije 1963. godine u Beogradu. Rad u Institutu za tuberkulozu u Sremskoj Kamenici započeo je 1960. godine. Radio je na Odeljenju za patofiziologiju disanja. Zahvaljujući njemu formiran je Zavod za patofiziologiju disanja, poznat u tadašnjoj SFR Jugoslaviji kao dijagnostički i naučno-istraživački centar.

Doktorsku disertaciju pod nazivom: „Evaluacija bronhopulmonalnih oboljenja s opstrukcijom disajnih puteva pomoću telesne pletizmografije“ odbranio je na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu 1976. godine. U zvanje asistenta izabran je 1964. godine na nastavnom predmetu Interna medicina sa pneumoftiziologijom. Zvanje primarijusa stekao je 1974. godine, zvanje docenta 1978. godine, zvanje vanrednog profesora 1984. godine, a zvanje redovnog profesora 1990. godine.

Držao je predavanja na posleddiplomskim studijama na Medicinskom fakultetu u Banja Luci i Sarajevu, Institutu za plućne bolesti i tuberkulozu u Golniku i Ljubljani, u Bolnici za plućne bolesti i tuberkulozu Zavoda za plućne bolesti i tuberkulozu u Zagrebu. Predavanja su mu bila sadržajna, a izlaganja jasna i praćena sa velikim interesovanjem. Bio je predavač sa velikim pedagoškim sposobnostima koje je lako prenosio na saradnike i učenike.

Pored srpskog jezika, govorio je tečno mađarski, nemački i engleski jezik. Bio je član više domaćih i međunarodnih stručnih i naučnih udruženja, predsednik Pneumoftiziološke sekcije SLD-DLV (biran u dva mandata), podpredsednik, a zatim i predsednik Crvenog krsta grada Novog Sada, član upravnih organa Instituta za plućne bolesti i tuberkulozu u Sremskoj Kamenici, član većeg broja komisija Medicinskog fakulteta i član tri međunarodne stručne organizacije. Bio je član Vojvođanskog ogranka Akademije nauka SLD-DLV. Od 1990. do 2000. godine bio je glav-

ni i odgovorni urednik časopisa „Saopštenja“ (kasnije preimenovan u „Pneumon“) koji od 1963. godine uređuje i objavljuje Institut za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici.

Tokom svoga rada boravio je na stručnom usavršavanju u inostranstvu (u tadašnjoj SR Nemačkoj, Holandiji i Švajcarskoj). Dobitnik je brojnih priznanja, diploma i plaketa od kojih je potrebno istaći: Povelju Grada Novog Sada, plaketu Medicinskog fakulteta, priznanja i Spomenicu Sekcija SLD-DLV za medicinu rada, Zahvalnice DLV 1981. godine, Spomen plaketu SLD, Medicinskog pregleda, Pneumoftiziološke sekcije DLV, Udruženja pneumoftiziologa Jugoslavije, Saveza lekarskih društava Jugoslavije, Gradskog zavoda za AT zaštitu u Beogradu, Instituta za plućne bolesti i tuberkulozu Sremska Kamenica, Somborskih medicinskih dana, Zavoda za plućne bolesti i tuberkulozu „Dr Vasa Savić“ u Zrenjaninu, Plaketu Akcione konferencije SSO Medicinskog fakulteta u Novom Sadu kao priznanje za izvođenje nastave, medalju Crvenog krsta Jugoslavije, Zlatni znak Crvenog krsta, više plaketa Crvenog krsta. Prof. dr Đorđe Tabori objavio je 166 stručnih i naučnih radova. Odlikovan je Ordenom za sluga za narod sa srebrnom zvezdom.

Bio je oženjen, otac je četvoro dece.

Otišao u penziju 01. 08. 1991. godine. Umro je dana 15.03. 2013.g. u 85. godini života.

Profesor dr Đorđe Tabori je bio eminentan stručnjak, naučni radnik i nastavnik sa velikim poštovanjem i velikim ugledom u zemlji i inostranstvu. Svojim dugogodišnjim radom u Institutu za plućne bolesti ugradio je svoju ličnost i dao ogroman doprinos razvoju medicine kako u stručnom, tako i u naučnom i nastavnom radu. Kao takav ostaće zauvek zapamćen od strane svih nas koji smo ga poznavali kao učitelja, kolegu, saradnika i prijatelja.