

Reproduzierbarkeit im induzierten Sputum bei Kindern mit Asthma

U. Reining, J. Mattes¹, K. Storm van's Gravesande², G. Ihorst, J. Kühn

Universitäts-Kinderklinik, Zentrum für Pneumologie, Allergologie und Mukoviszidose (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. M. Brandis), Freiburg

¹ Division of Biochemistry and Molecular Biology, The John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra, Australia

² Brigham and Women's Hospital, Pulmonary Division, Thorn building 8th floor, 75 Francis Street, Boston, MA 02115

Zusammenfassung: Bei Kindern mit Asthma bietet sich die Sputum-Induktion mit hypertoner Kochsalzlösung als nicht-invasive Methode zur Quantifizierung der eosinophilen Inflammation an. Es ist unklar, inwieweit das komplexe Manöver der Sputum-Induktion auch bei Kindern anwendbar und sicher ist. Wir untersuchten daher zweimal im Abstand von 6 Wochen 9 nicht-atopische Kontrollprobanden sowie 34 Kinder mit stabilem Asthma bronchiale im Alter von 6–18 Jahren, von denen letztere in n=25 Fällen Budesonid (400–1200 µg/die) und in n=9 Fällen DNCG (60 mg/die) inhalierten. Nach der Prämedikation mit 200 µg Salbutamol erfolgte die Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung (3, 4 und 5%) für insgesamt 30 Minuten, während alle 5 Minuten die Lungenfunktion kontrolliert wurde und versucht wurde, Sputum zu expektorieren. Nach der Abtrennung der Sputum-Flocke vom umgebenden Speichel wurde die Sputumflocke mittels Zählkammer, Cytospinpräparat sowie Messung des Eosinophilen Cationischen Proteins (ECP) charakterisiert. Die Sputum-Gewinnung ließ sich in 84 von 86 beabsichtigten Tests (97,7%) durchführen, wobei keine klinische Beeinträchtigung objektivierbar war. Der durchschnittliche Abfall des FEV₁-Werts nach der Sputum-Induktion betrug 3,0% (Median; Maximum 11,0%). Die Reproduzierbarkeit der relativen Eosinophilen-, Neutrophilen- sowie Lymphozytenzahl (5–95%-Werte Test1: 0,0–4,2% bzw. 0,8–11,4% bzw. 3,2–35,1%) des Sputum-Differential-Zellbildes war befriedigend für die Eosinophilen sowie Neutrophilen (Intraclass-Correlations-Coefficient (ICC) 0,41) und für Lymphozyten (ICC = 0,49). Für ECP (5–95%-Werte Test1: 39,8–8000,0 µg/l) war die Reproduzierbarkeit (ICC = 0,24) ausreichend. Die ICC-Werte für Gesamtzellzahl (ICC = 0,31) und Gewicht der Sputumflocke (ICC = 0,30) ergaben eine ausreichende Reproduzierbarkeit. Mit Hilfe des dargestellten Vorgehens ist die Sputum-Induktion im Kindesalter in aller Regel durchführbar und sicher. Als befriedigend reproduzierbare Parameter empfehlen sich die Anteile an eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie an Lymphozyten.

Reproducibility in the Induced Sputum in Childhood: In asthmatic children sputum-induction with hypertonic saline is useful to quantify the eosinophilic inflammation. However, only few data are available about feasibility and safety of the procedure in children. Therefore, taking 9 non-atopic healthy control children (mean age 11,8 years) and 34 asthmatic children (mean age 11,4 years), inhaling n=25 Budesonid (400–1200 µg/die) and n=9 DNCG (60 mg/die), sputum induction was performed twice within 6 weeks. Briefly, 10 minutes after

inhalation of 200 µg salbutamol subjects inhaled hypertonic saline (3, 4 and 5%) for in all 30 minutes, while all 5 minutes lung function was checked and expectoration of sputum was supported. Adequate sputum plugs were separated from contaminating saliva and processed immediately employing native chamber and cytospin cell count as well as measurement of eosinophilic cationic protein (ECP). Sputum-induction could be performed in 84 out of 86 planned tests (97,7%) without any objective clinical adverse effects. The mean fall in FEV₁ was 3,0%, the maximum 11,0%. The reproducibility of eosinophil, neutrophil and lymphocyte differential cell count (5–95%-values Test1: 0,0–4,2%, 0,8–11,4%, and 3,2–35,1%, respectively) was moderate for eosinophils and neutrophils (Intraclass-Correlation-Coefficient (ICC) 0,41) as well as for lymphocytes (ICC = 0,49). For ECP 5–95%-values Test1: 39,8–8000,0 µg/l) only a fair reproducibility (ICC = 0,24) was found. The ICC levels for total cell count (ICC = 0,31) and for weight of the sputum plug (ICC = 0,30) were also fair. Based on the procedure presented induced sputum is a feasible and safe method in childhood. The differential sputum cell count of eosinophils, neutrophils and lymphocytes can be recommended as parameters with moderate reproducibility.

Einleitung

Die eosinophile Inflammation der Atemwege spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale [1,2,3]. Um bei Asthma im Kindes- und Jugendalter unter antiinflammatorischer Therapie Verlaufskontrollen direkt am Bronchialsystem vornehmen zu können, ist ein sicheres und nicht-invasives Verfahren erforderlich. Die zur Zeit einzige derartige Methode ist die Untersuchung von Sputum [4,5]. Inzwischen wurden Sputum-Gewinnung und Materialaufarbeitung technisch so verbessert, so dass valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden können [6,7]. Da Kinder und Jugendliche oft nicht in der Lage sind, spontan Sputum zu produzieren und zu expektorieren, ist hier die Methode der Sputum-Induktion mit hypertoner Kochsalzlösung vorteilhaft. Allerdings muss die bronchokonstriktorische Wirkung der hypertonen Kochsalzlösung gerade bei Kindern mit Asthma berücksichtigt werden [8,9]. In vorliegender Studie wurden neben der Durchführbarkeit der Sputum-Induktion vor allem deren Sicherheit sowie Reproduzierbarkeit über sechs Wochen untersucht.

Material und Methoden

Lungenfunktionsprüfung

Es erfolgten Lungenfunktionsprüfungen mit einem Masterlab® (E. Jaeger, Würzburg) entsprechend internationalen Richtlinien [10]. Das höchste FEV₁ von zwei reproduzierbaren Fluss-Volumen-Kurven wurde verwendet, sofern die Differenz zwischen der forcierten Vitalkapazität (FVC) ≤ 5% war. Es erfolgte (nach Länge und Gewicht) die Berechnung von %-Sollwerten [11].

Patienten

Es nahmen 34 Kinder mit stabilem Asthma bronchiale (Alter 6–16 Jahre, Median 11,4 Jahre) sowie 9 nicht-atopische (Haut-Prick-Test und Anamnese) Kontrollen (8–18 Jahre, Median 11,8 Jahre) teil. In jeder Gruppe waren acht Mädchen. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig und erfolgte nach umfassender mündlicher sowie schriftlicher Aufklärung der Eltern und Kinder sowie nach schriftlicher Einverständniserklärung. Das positive Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg lag vor (Votum-Nr. 213/97). Steroid (400–1200 µg Budesonid/die) erhielten 25 Asthmatiker und 9 erhielten ein DNCG-Präparat (60 mg/die). Zweimal wurde im 6-Wochen-Abstand getestet.

Sputum-Gewinnung

Das Protokoll von Pin et al. wurde zugrundegelegt [12]. Zehn Minuten nach Gabe von 200 µg Salbutamol wurde dreimal unter Steigerung der Konzentration für je zehn Minuten vernebelte Kochsalzlösung (NaCl-Lösung, 3%, 4% und 5%; Ultraneb 2000; Devilbiss, Somerset, PA, USA; maximale Verneblerleistung 4,5 ml/Minute) inhaliert. Vor dem Test und alle fünf Minuten unter Inhalation erfolgten Lungenfunktionskontrollen. Unterschritt das FEV₁ 90% des Ausgangswertes, so erfolgte keine Konzentrationssteigerung; bei Unterschreitung von 80% des Ausgangswertes war ein Abbruch der Sputum-Induktion vorgesehen. Nach der Inhalation erfolgten Mund- und Rachenausspülen mit Wasser, Naseschneuzen und Wasserschlucken. Sputum wurde erstmals nach einer Inhalationsphase von 10 Minuten und anschließend alle 5 Minuten je einmal (also insgesamt 5- bis 6-mal) expektoriert. Wegen zu Anfang geringer Menge wurde nicht fraktioniert analysiert. Vor der ersten Sputum-Expektoration wurde zusätzlich eine Speichelprobe gewonnen. Geeignete Sputumflocken wurden separiert, um die Kontamination der Flocken mit Speichel zu minimieren [13]. Qualitative Charakteristika der erhaltenen Sputumproben wurden makroskopisch beurteilt [12].

Sputum-Aufarbeitung

Die umgehende Verarbeitung von Sputumflocke und Speichelprobe erfolgte nach dem Protokoll von Holz et al. [14]. Nachdem das Gewicht der Proben ermittelt und die Flocken mit zwei Volumeneinheiten, die Speichelproben mit einer Volumeneinheit Dithiothreitol (DTT) 0,1% (Sputolysin, Calbiochem, Bad Soden), versetzt worden waren, wurden die Proben vorsichtig mit einem Vortex gemischt, für 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und alle fünf Minuten vorsichtig geschüttelt. Eine 20fache Verdünnung wurde durch Zu-

gabe von PBS-Puffer erreicht. Es erfolgte Zentrifugation bei 600 × g und 4 °C für 10 Minuten und anschließend die Abnahme des Überstandes der Sputumflocke, welcher bei –70 °C eingefroren wurde. Es folgte Resuspension in 200 µg bovinem Serum-Albumin (1%). Die absolute Zellzahl wurde in der Zählkammer, und die Vitalität wurde anhand Trypanblaufärbung bestimmt. Jeweils 3–6 × 10⁴-Zellen wurden für Cytopspins verwendet (Shandon cytocentrifuge 3®, Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA, USA), die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurden. Mindestens 400 nicht-epitheliale Zellen wurden gezählt.

Sputum-Analyse

Im Überstand der Sputumproben wurde das eosinophile cationische Protein (ECP) mittels Fluorimmunoassay (ECP FEIA®, Pharmacia & Upjohn, Freiburg) bestimmt.

Statistische Auswertung

Zur Deskription werden Median und 5–95%-Intervall angegeben. Bei Unterschreitung des ECP-Detektionslimits von 2 µg*1⁻¹ (verdünnte Probe: 40 µg*1⁻¹) bei n = 4 (zwei Asthmatiker, zwei Kontrollen) wurde auf 1,99 µg*1⁻¹ (verdünnte Probe: 38,9 µg*1⁻¹) gesetzt. Für kontinuierliche Variablen erfolgte die Testung bei zwei Gruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest (bei drei Gruppen Kruskal-Wallis-Test). Differenzen innerhalb der Gruppe wurden als Paardifferenzen nach Wilcoxon getestet. Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurden limits of agreement (C_R-Wert) berechnet (Grenzen, in denen die Abweichungen der Werte mit 95%iger Wahrscheinlichkeit liegen [15]). Der Intraclass-Correlation-Coefficient (ICC) beschreibt die Zusammenhangstärke der Messwerte in einer „Klasse“ (eine Klasse ist ein Proband) [15]. Ferner wurde die Spearman-Rangkorrelation eingesetzt. Allgemein wurde für p-Werte < 0,05 statistische Signifikanz angenommen (α = 5%). Es wurde das Statistical-Analysis-System (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet.

Ergebnisse

Durchführbarkeit und Sicherheit

Alle Patienten standen schon zu Beginn seit mindestens vier Wochen konstant unter Therapie. Für den gesamten Beobachtungsverlauf wurden keine anamnestic Asthmaverschlechterungen oder Medikationsänderungen berichtet. Ein stabiler Asthmatiker (n = 1) konnte wegen Unterschreitung des FEV₁-Sollwerts von 80% vor beiden Tests keine Sputum-Induktion bekommen. Die übrigen 84 der 86 beabsichtigten Tests konnten durchgeführt werden (97,7%). Bei 84 Sputum-Induktionen wurde in einem einzigen Fall eine Abnahme des FEV₁ > 10% nach Inhalation beobachtet. In keinem Fall musste vorzeitig abgebrochen werden. Der Median des FEV₁-Abfalls ist 3,0%, das Maximum 11% (5–95%-Intervall: 11%–4%).

Ergebnisse in den verschiedenen Gruppen

Während die ECP-Konzentrationen im Speichel von Asthmatikern in 37 von 41 Proben das Detektionslimit unterschritt, war dies in der Sputum-Flocke nur in 7 der 41 Proben der Fall (alle Laboranalysen „blind“ durchgeführt).

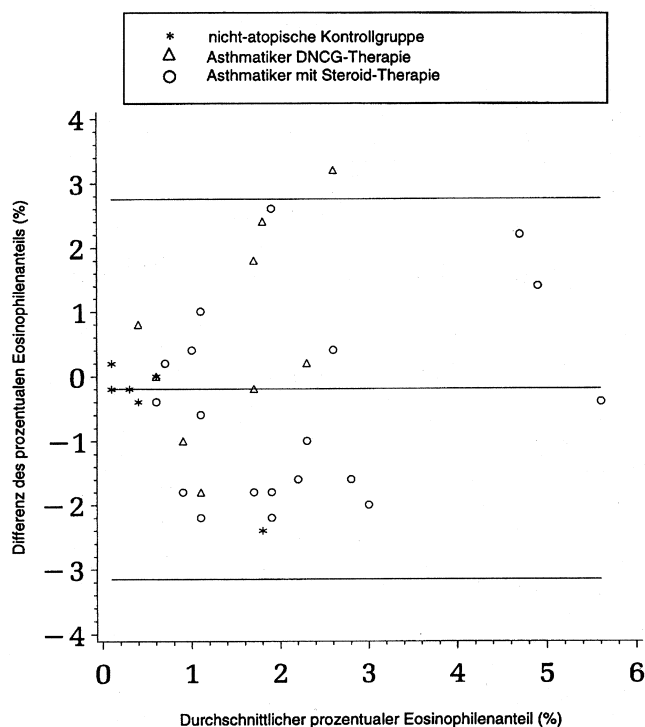


Abb. 1 Grafische Darstellung der Reproduzierbarkeit als Differenz des prozentualen Eosinophilenanteils der Sputum-Flocke (innerhalb durchschnittlich 6 Wochen) in Abhängigkeit des durchschnittlichen Anteils (arithmetisches Mittel der Eosinophilenanteile). Die horizontalen Linien markieren bez. der Differenz den Mittelwert und die Grenzen von jeweils 2 Standardabweichungen.

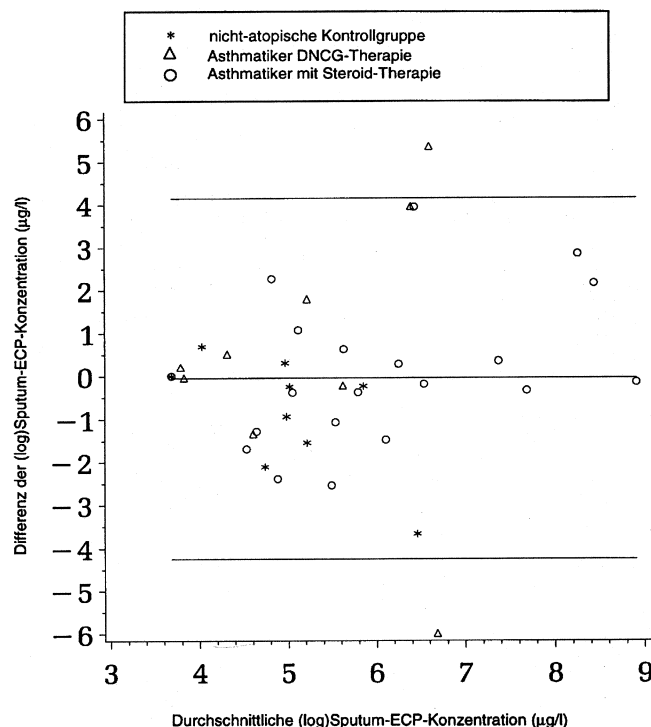


Abb. 2 Grafische Darstellung der Reproduzierbarkeit als Differenz der beiden logECP-Konzentrationen der Sputum-Flocken (innerhalb durchschnittlich 6 Wochen) in Abhängigkeit der durchschnittlichen Konzentration (arithmetisches Mittel der logECP-Werte). Die horizontalen Linien markieren bez. der Differenz den Mittelwert und die Grenzen von jeweils 2 Standardabweichungen.

Reproduzierbarkeit

Bei 38 der zweimal untersuchten Probanden konnte die Reproduzierbarkeit getestet werden. Hierbei wurde in 35 Fällen zu beiden Zeitpunkten ein auswertbares Cytospinpräparat erhalten. **Abb. 1** und **2** zeigen die Ergebnisse für die ECP-Konzentration und den prozentualen Eosinophilenanteil. Weder die Differenz der Eosinophilen noch die Differenz des ECP steht mit der durchschnittlichen Höhe (arithmetisches Mittel) in Beziehung (**Abb. 1** bzw. **2**). Beim zweiten Test zeigt sich in beiden Asthmatikergruppen eine Abnahme des Gewichts der Sputumflocke (**Tab. 1**). Die ICC-Werte ergaben für alle drei Parameter eine ausreichende Reproduzierbarkeit (**Tab. 2**). In **Tab. 3** sind die prozentualen Anteile der einzelnen Zellarten und die jeweiligen Reproduzierbarkeitskoeffizienten dargestellt.

Diskussion

Sicherheit

Da Asthmatiker auf die Inhalation von vernebelter hypertoner Salzlösung mit einem Abfall des FEV₁-Werts reagieren können [8,9], ist das Induktionsprotokoll im Sinne notwendiger Sicherheit zu standardisieren [17]. In vorliegender Studie wurde die Induktion, aber auch die Aufarbeitung und Analyse der Proben, zur Optimierung des Standards nach genau definierten Protokollen vorgenommen [12,14]. In einem Kollektiv von 78 Erwachsenen reagierten 11 trotz vorheriger

Bronchodilatatorgabe mit einem FEV₁-Abfall von 20% oder mehr, wobei jedoch 10 Probanden ein Ausgangs-FEV₁ von weniger als 80% des Sollwertes hatten [9]. In einer weiteren Studie zeigten 17 bis 19% von Adulten mit schwerer Asthmaausprägung FEV₁-Abfälle von 10–20% [20]. Bei Kindern wurden unter Sputum-Induktion peakflow-Rückgänge um immerhin 5% berichtet [21]. Entsprechend den aktuellen Empfehlungen [6,12,22,23] wurde in vorliegender Studie die Sputum-Induktion ausschließlich an klinisch-anamnestisch stabilen Probanden mit einem FEV₁ von über 80% des Sollwertes und nach Prämedikation mit Salbutamol durchgeführt. Diese standardisierten Sicherheitsbedingungen lassen verstehen, dass bei n=84 Induktionen lediglich einmal ein FEV₁-Abfall > 10% auftrat. Auf der anderen Seite konnten 97,7% der rekrutierten Probanden erfolgreich untersucht werden. Aufgrund dieser Konstellationen können wir die von uns eingehaltenen Sicherheitsstandards für die Induktion mit hypertoner Kochsalzlösung bei Kindern mit stabilem Asthma bronchiale auch für zukünftige Studien empfehlen.

Durchführbarkeit

Das Verfahren beruht auf der Inhalation vernebelter hypertoner Kochsalzlösung zur Induktion der Sputum-Produktion und der nachfolgenden technischen Unterstützung der Expektoration [4,5]. Vermutlich entfaltet die Induktion über einen vermehrten Ausstrom von Wasser über die Atemwegsepithelien, eine Stimulation von Hustenrezeptoren, eine direkte Stimulation der mukoziliären Clearance [6], sowie eine Kon-

Tab. 1 Sputum-Gewicht, Sputum-Zellzahl und Sputum-ECP-Konzentration und relative Eosinophilenzahl in den verschiedenen Gruppen bei Test 1 und Test 2

Variablen	stabile Asthmatiker mit Steroid-Therapie n = 24 Median (90%-Intervall)	stabile Asthmatiker mit DNCG-Therapie n = 9 Median (90%-Intervall)	nicht-atopische Kontrollen n = 9 Median (90%-Intervall)	p-Wert innerhalb der drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test)
Test1				
Gewicht der Sputumflocke in mg	74,0 (28,5–306,9)	70,5 (29,8–105,8)	49,8 (30,4–103,7)	0,33
absolute Zellzahl in der Sputumflocke	1 611 250 (287 500–4 475 000)	587 500 (187 500–4 537 500)	1 437 500 (325 000–3 300 000)	0,04
ECP-Konzentration in µg/l	453,0 (39,8–2600,0)	75,0 (39,8–1600,0)	234,0 (39,8–4000,0)	0,02
Eosinophile in % zur Gesamtzellzahl	2,4 (0,6–4,2)	1,0 (0,0–2,2)	0,5 (0,0–3,0)	0,004
Test2				
Gewicht der Sputumflocke in mg	56,5 (29,6–562,3)	34,5 (11,4–304,8)	95,9 (25,6–444,6)	0,16
absolute Zellzahl in der Sputumflocke	1 318 750 (318 750–1 103 750)	1 150 000 (350 000–2 200 000)	1 450 000 (375 000–8 400 000)	0,52
ECP-Konzentration in µg/l	332,0 (39,8–1476,0)	96,2 (39,8–1064,0)	91,2 (39,8–308,0)	0,12
Eosinophile in % zur Gesamtzellzahl	1,5 (0,0–5,7)	1,6 (0,2–4,2)	0,2 (0,0–0,6)	0,006

Tab. 2 Reproduzierbarkeit der Gesamtzellzahl in der Sputumflocke, des Sputum-Gewichts und der Sputum-ECP-Konzentration für Test1 und Test 2 in der Gesamtpopulation.

Variablen	Gesamtzellzahl in der Sputumflocke	Gewicht der Sputumflocke in mg	ECP-Konzentration in µg/l
Gesamtpopulation (n = 38)			
Test1 (Median und 90%-Intervall)	1 362 500 (187 500–4 537 500)	62,3 (28,5–306,9)	225,0 (39,8–8 000,0)
Test2 (Median und 90%-Intervall)	1 212 500 (350 000–8 400 000)	50,8 (22,1–444,6)	157,7 (39,8–13 520,0)
p-Wert (Differenz zwischen Test1 und 2)	0,5	0,61	0,69
C _R -Wert (limits of agreement)	1,1 (0,1–10,0)	1,0 (0,1–7,2)	0,9 (0,01–63,1)
ICC-Wert (95%-Konfidenzintervall)	0,31 (–0,002–0,57)	0,30 (–0,02–0,56)	0,24 (–0,08–0,51)

Tab. 3 Reproduzierbarkeit des Differenzial-Zellbilds für Test 1 und Test 2 in der Gesamtpopulation.

Variablen	Eosinophile in %	Neutrophile in %	Lymphozyten in %	Makrophagen in %	Epithelien in %
Gesamtpopulation (n = 35)					
Test1 (Median und 90%-Intervall)	1,4 (0,0–4,2)	3,4 (0,8–11,4)	16,2 (3,2–35,1)	68,8 (48,4–85,2)	5,2 (0,0–44,0)
Test2 (Median und 90%-Intervall)	0,8 (0,0–5,6)	2,8 (0,6–5,4)	12,4 (3,0–36,4)	74,4 (39,6–87,4)	5,0 (0,8–30,0)
p-Wert (Differenz zwischen Test1 und 2)	0,16	0,04	0,11	0,14	0,95
C _R -Wert (limits of agreement)	0,7 (0,07–8,2)	0,8 (0,2–3,1)	0,8 (0,2–3,1)	1,0 (0,6–1,8)	1,2 (0,04–33,0)
ICC-Wert (95%-Konfidenzintervall)	0,41 (0,10–0,65)	0,41 (0,09–0,65)	0,49 (0,19–0,70)	0,17 (–0,16–0,47)	0,27 (–0,06–0,55)

traktion glatter Muskelzellen [17] ihre Wirkung. Vergleiche bronchialer Lavagen mit bronchialen Biopsien, die eine gute Übereinstimmung mit den Befunden nach Sputum-Induktion zeigen, lassen annehmen, dass das induzierte Sputum aus den größeren, zentralen Bronchien stammen [6,19]. Zur Sputum-Aufarbeitung sind in der Literatur im Wesentlichen zwei Techniken beschrieben: die Analyse des gesamten expektorierten Sputummaterials und die selektive Analyse der Sputumflocke [18]. Die Analyse der gesamten Sputumprobe [6] hat den Nachteil, dass aufgrund von Dilution durch Speichel die exakte Quantifizierung beeinträchtigt wird. Für die Selektion der Sputumflocke aus dem Gesamtexpektorat wurden in verschiedenen Studien Vorteile nachgewiesen [6,12,13,18]. Zwar erscheint die Distinktion zwischen Astmatikern und nicht-asthmatischen Kontrollen auch mit der Methode der gesamten Sputumprobe möglich [18], jedoch ist im selektierten Sputum ein erhöhter Anteil vitaler Zellen sowie ein höherer Anteil Eosinophiler nachweisbar [13], und ferner ist die ECP-Konzentration gegenüber der Gesamtprobe um das Fünf- bis Sechsfache höher [6,13,18]. Daher ist im Hinblick auf ECP-Bestimmung und Differenzialzytologie die Abtrennung der Sputumflocke der Analyse des Gesamtexpektorats in wichtigen Punkten überlegen.

Reproduzierbarkeit

Da trotz breiter Streuung von ECP und Eosinophilen keine Abhängigkeit der Reproduzierbarkeit von der Höhe der Werte erkennbar ist (Abb. 1 und 2), dürften unsere Angaben auch für Kollektive mit anderer Ausprägung der Parameter aussagekräftig sein. Die Reproduzierbarkeit der ECP-Konzentration im Sputum war mit einem ICC von 0,24 relativ schlecht (Tab. 2). Da Spanevello et al. [24] und In't Veen et al. [25] bei adulten Astmatikern über zwei Wochen (ICC = 0,70) bzw. mindestens zwei Tagen (ICC = 0,82) eine gute bis sehr gute Reproduzierbarkeit fanden, nehmen wir an, dass unser relativ langer Zeitraum und potenziell auch die Entzündungsabläufe beim Kind zu einer größeren Variabilität beitragen. Andererseits fanden wir für die Gesamtzellzahl (Tab. 2), wie andere über nur 6 Tage [27], immerhin noch eine ausreichende Reproduzierbarkeit. Aufgrund befriedigender Reproduzierbarkeit von Eosinophilen- (ICC = 0,41), Neutrophilen- (ICC = 0,41), sowie Lymphozyten-Anteil (ICC = 0,49) werden aktuelle Standardisierungs-Empfehlungen, die die Darstellung des Differenzial-Zellbildes gerade anhand von relativen Zellzahlen nahelegen [26], bestätigt. Interessanterweise zeigt sich bei den steroidtherapierten Astmatikern in Test1 ein wesentlich höherer Eosinophilen-Anteil als bei den DNCG-therapierten Patienten. Auch zeigen sich in den beiden Gruppen von Test1 zu Test2 für die Zellzahl gegenläufige Entwicklungen. Da die Patienten schon vor Test1 mehrere Wochen so therapiert waren wie zwischen den Tests, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Diskrepanz zwischen den beiden Gruppen unterschiedlichen Therapie-Effekten entspricht. Jedoch liegt in beiden Gruppen ein unterschiedlicher Asthma-Schweregrad vor. Neben der Therapie und dem Schweregrad kann der Abstand zwischen den Untersuchungen die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen [28,29]. Daher könnte die Kurzzeitreproduzierbarkeit (wenige Tage) der von uns verwandten Parameter wesentlich günstiger ausfallen. Dennoch erscheint uns die längere Zeitspanne relevant, da klinische Annahmen zum (vollen) Therapieeffekt, z.B. von Steroiden, als auch Therapiestudien nicht selten auf Intervallen von mehreren Wochen beruhen. Diese Überlegun-

gen sollten bei neuen Längsschnittstudien berücksichtigt werden, um abhängig vom Beobachtungszeitraum differenzierende Richtlinien formulieren zu können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion von Sputum mittels hypertoner Kochsalzlösung bereits im Kindesalter (ab 6 Jahren) problemlos durchzuführen ist. Trotz bronchokonstriktorischer Wirkung der hypertonen Kochsalzlösung ist die Methode sicher. Die mit der Sputum-Induktion ermittelten Anteile an Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten sind valide und auch über sechs Wochen befriedigend reproduzierbar.

Danksagung: Wir danken der Arbeitsgruppe des Zentrums für Pneumologie in Großhansdorf für die freundliche Unterstützung bei der Etablierung der Methode der Sputum-Gewinnung sowie der Sputum-Aufarbeitung.

Literatur

- Huber HL, Koessler KK. The pathology of bronchial asthma. Arch Intern Med 1922; 30: 689–760
- Ellis AG. The pathological anatomy of bronchial asthma. Am J Med Sci 1980; 136: 407–429
- Venge P. Role of eosinophils in childhood asthma inflammation. Ped Pulmonol Supplement 1995; 11: 34–35
- Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. J Allergy Clin Immunol 1998; 102: 100–101
- Hargreave FE. The investigation of airway inflammation in asthma: sputum examination. Clin Exp Allergy 1997; 27: 36–40
- Pavord ID, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. Thorax 1997; 52: 498–501
- Hargreave FE, Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: S53–S57
- Tarodo de la Fuente P, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1127–1130
- Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 299–303
- American Thoracic Society. Standardization of spirometry. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 1285–1298
- Zapletal A, Samanek M, Paul T. Lung function in children and adolescents: methods and reference values. In: Herzog (Hrsg). Progress in Respiratory Research. Basel: Karger Verlag, 1987. 173–196
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. Thorax 1992; 47: 25–29
- Gershman NH, Wong HH, Liu JT, Mahlmeister MJ, Fahy JV. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. Eur Respir J 1996; 9: 2448–2453
- Holz O, Joerres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. Clin Exp Allergy 1998; 28: 284–292
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurements. Lancet 1986; 1: 307–310
- Altman DG. Practical statistics for medical research. London, Weinheim: Chapman & Hall, 1997. 403–406

- ¹⁷ Fahy JV. A safe, simple, standardized method should be used for sputum induction for research purposes. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1047–1049
- ¹⁸ Spanevello A, Beghé B, Bianchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M, Ind PW. Comparison of two methods of processing induced sputum: selected versus entire sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 665–668
- ¹⁹ Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997; 52: 372–374
- ²⁰ de la Fuente PT, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1127–1130
- ²¹ Twaddell SH, Gibson PG, Carty K, Woolley KL, Henry RL. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996; 9: 2104–2108
- ²² Hunter CJ, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. *Respir Med* 1999; 93: 345–348
- ²³ Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Sputum induction as a method of analyzing pulmonary cells: reproducibility and acceptability. *J Asthma* 1999; 36: 335–341
- ²⁴ Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, Ballardini L, Bridge P, Pisati P, Neri M, Ind PW. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1138–1144
- ²⁵ In't Veen JC, de Gouw HW, Smits HH, Sont JK, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 2441–2447
- ²⁶ Haslam PL, Baughman RP. Introduction. *Eur Respir Rev* 1999; 9: 25–27
- ²⁷ Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 308–317
- ²⁸ Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 1998; 53: 87–90
- ²⁹ Faul JL, Demers EA, Burke CM, Poulter LW. The reproducibility of repeat measures of airway inflammation in stable atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1457–1461

PD Dr. J. Kühn
Universitäts-Kinderklinik
Arbeitsgruppe Pneumologie
Allergologie und Mukoviszidose
Mathildenstraße 1
79106 Freiburg
Deutschland
E-mail: kuehr@200.ukl.uni-freiburg.de