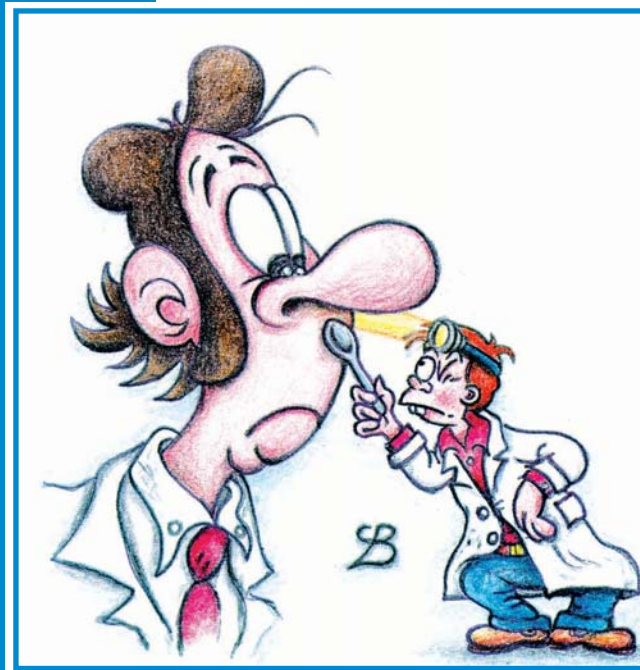




UN SERVIZIO UCB PHARMA DESTINATO AI SIGG. MEDICI
DI CUI È VIETATA LA VENDITA

Vittorio Ricca
Giorgio Ciprandi

LA CITOLOGIA NASALE NELLA PRATICA CLINICA



LA CITOLOGIA NASALE NELLA PRATICA CLINICA

Vittorio Ricca
Servizio di Allergologia
Ospedale Koelliker-Missionari della Consolata
Torino

Giorgio Ciprandi
Clinica delle Malattie Allergiche e Immunologiche
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Genova

LA CITOLOGIA NASALE NELLA PRATICA ALLERGOLOGICA

Introduzione

La rinite allergica è una patologia che è in costante incremento dal punto di vista epidemiologico, rappresentando pertanto la prima malattia immunologicamente mediata. Stime abbastanza corrette indicano che in Italia circa il 20% della popolazione è affetto da rinite allergica, ma sicuramente nella fascia pediatrica questi valori sono in continuo incremento. Peraltro oltre il 40% della popolazione generale presenta una positività alle prove allergometriche cutanee e, anche se la metà di queste persone non presenta manifestazioni allergiche, è sicuramente a rischio di svilupparle. Questo fenomeno rende quindi conto di come le reazioni allergiche possano interessare quasi una persona su due.

Un altro aspetto molto importante è che frequentemente la patologia rinitica si presenta associata ad altre manifestazioni quali la poliposi nasale, la congiuntivite (presenza pressochè costante nella forma stagionale), l'otite media sierosa, la sinusite, l'asma bronchiale e le dermatite allergiche. Inoltre la stragrande maggioranza dei soggetti allergici presenta una polisensibilizzazione, aspetto che sommato al precedente evidenzia l'importanza clinica e sociale della patologia rinitica.

La definizione di rinite allergica presuppone da un lato la presenza di una serie tipica di sintomi nasali: il prurito, le salve di starnuti, la rinorrea e l'ostruzione nasale, talora nelle forme particolarmente severe si può giungere anche all'ipo-anosmia. L'altro aspetto è caratterizzato, come presunto dal suffisso, dall'esistenza di un processo infiammatorio sottostante.

Il concetto di flogosi allergica peraltro è un'acquisi-

zione abbastanza recente, in quanto fino a non molti anni fa le manifestazioni allergiche venivano inquadrate come fenomeni che tendevano ad esaurirsi poco dopo la comparsa dei sintomi allergici. L'unica cellula effettrice era considerata il mastocita e l'istamina il mediatore più importante. Per questo motivo le malattie allergiche erano definite anche come reazioni di ipersensibilità immediata.

Le recenti scoperte, di ordine dapprima sperimentale poi anche cliniche, hanno evidenziato in maniera inconfutabile che la reazione allergica è fin dall'inizio caratterizzata dal richiamo a livello mucosale di cellule infiammatorie e che soprattutto la risposta infiammatoria persiste nel tempo, anche in assenza di sintomi allergici. Questo punto verrà in seguito adeguatamente discusso, anche in considerazione del notevole rilievo che presenta dal punto di vista terapeutico.

L'inquadramento diagnostico della rinite allergica è un aspetto particolarmente cruciale, in quanto tende a definire con certezza la peculiarità etiopatogenetica di questa manifestazione. La complessità consiste non solo nell'elevato numero di strumenti diagnostici a disposizione, ma anche nell'abbondanza di entità nosografiche comprese nella classificazione delle riniti, che devono essere considerate nella diagnostica differenziale (Tab. 1).

Esiste anzitutto una prima fondamentale distinzione in forme infiammatorie, non infiammatorie e legate a fenomeni meccanici.

Le forme infiammatorie vengono distinte in forme infettive e non infettive. Quelle non infettive sono a loro volta distinte in allergiche, non allergiche con infiltrato eosinofilo, la poliposi nasale, la mastocitosi e la rinite atrofica.

Le forme non-infiammatorie sono costituite da due gruppi fondamentali: la rinopatia vasomotoria legata ad una disfunzione autonoma o associata a squilibri ormonali sistemici (tireopatie, gravidanza etc) e la

Tab. 1 - Classificazione delle riniti.

<p><u>Riniti infiammatorie</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Rinite allergica stagionale perenne episodica- Rinite eosinofila non allergica- Rinite basofila non allergica- Rinite infettiva virale batterica fungina- Poliposi nasale- Rinite atrofica <p><u>Riniti non infiammatorie</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Rinite vasomotoria da disfunzione autonoma associata a squilibri sistemici (endocrinopatie, gravidanza, etc)- Rinite medicamentosa da abuso di vasocostrittori topici da farmaci sistemici (antiipertensivi, contraccettivi, etc) <p><u>Riniti meccaniche</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Deformità anatomiche (deviazione settale, patologie ciliari, etc)- Ostruzioni (ipertrofia turbinati, ipertrofia adenoidea, corpi estranei, tumori, etc)

rinite iatrogena (dovuta all'abuso di vasocostrittori o a farmaci antiipertensivi o contraccettivi).

Le riniti meccaniche sono generate da alterazioni anatomiche (deviazioni del setto) o funzionali (disfunzioni ciliari) o a lesioni occupanti spazio (ipertrofia adenoidea, corpi estranei, tumori).

L'iter diagnostico è pertanto abbastanza articolato

Tab. 2 - Iter diagnostico della rinite allergica.

<ul style="list-style-type: none">- Anamnesi - Esame obiettivo locale (rinoscopia) generale - Accertamenti allergologici indagini di primo livello: prove allergometriche cutanee indagini di secondo livello: dosaggio IgE specifiche indagini di terzo livello: challenge allergene-specifico - Accertamenti specialistici ORL rinomanometria rinometria acustica olfattometria funzionalità mucociliare - Accertamenti morfologici Citologia Endoscopia a fibre ottiche Radiologia tradizionale Tomografia computerizzata Risonanza magnetico-nucleare - Accertamenti microbiologici - Accertamenti laboratoristici eosinofilia ematica dosaggio mediatori (sierici,nasali)

(Tab 2) e si fonda su una serie di indagini di ordine generale, in particolare l'anamnesi e l'esame obiettivo rappresentano la premessa fondamentale per un corretto svolgersi di una razionale procedura. Seguono poi le indagini prettamente allergologiche tese anzitutto a definire la patogenesi allergica e quindi ad individuarne la causa. Esse sono tradizionalmente suddivise in indagini di primo livello (le

prove allergometriche cutanee), di secondo (la determinazione delle IgE specifiche sieriche) e di terzo (la provocazione con l'allergene a livello degli organi bersaglio).

Esistono inoltre una serie di accertamenti di competenza più specificamente rinoiatria, quali: la rinoscopia, l'endoscopia, la rinomanometria, la rinometria acustica, l'olfattometria e la valutazione della motilità ciliare.

In casi particolarmente selezionati si può ricorrere ad indagini di imaging: la radiografia standard, la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica.

Le indagini di laboratorio consistono nella valutazione degli eosinofili circolanti, nello studio colturale del tampone nasale e nel rinocitogramma.

Quest'ultima indagine diagnostica rappresenta sicuramente una preziosa fonte di informazioni utilizzabili non solo dal punto di vista strettamente diagnostico, ma anche come vedremo prognostico e terapeutico.

Prima di descrivere in dettaglio le indicazioni, la metodologia, l'interpretazione e le applicazioni di questa indagine, ci pare opportuno presentare una sintetica premessa sulla composizione fisiologica e patologica della mucosa nasale e sulla fisiopatologia della flogosi allergica, per poter meglio comprendere le finalità di questo strumento diagnostico.

CARATTERISTICHE DELLA MUCOSA NASALE

L'apparato respiratorio dell'uomo è un complesso sistema di canali di vario calibro caratterizzato da due vie d'ingresso (e fuoriuscita) dell'aria, una specificatamente *dedicata* allo scopo (il naso) ed un'altra *accessoria* (la bocca), attraverso cui l'aria entra con le caratteristiche dell'ambiente esterno e da cui dopo la distribuzione ed il ricircolo nelle vie aeree torna ad uscire con le modifiche apportate dall'azione di scambio gassoso svolta.

Il naso esterno, variabile per aspetto in rapporto alle caratteristiche genico-etniche che ne condizionano l'aspetto (caucasico, negroide, camuso, greco...), delimita uno spazio suddiviso in due metà più o meno simmetriche da un setto, che nella parte estrema prende il nome di vestibolo, dal quale attraverso uno spazio ristretto, narice interna o valvola del naso, si accede ad un'altro "locale": la **fossa nasale**.

Ciascuna fossa nasale è assimilabile ad un tronco di piramide eretta su base quasi rettangolare, sulla cui parete laterale si trovano tre sporgenze ossee definite **turbinati** per il loro aspetto a vortice, e distinti in base alla posizione in *inferiore*, *medio* e *superiore*, ed alcuni sottili fori, che sono il punto di collegamento con le concamerazioni delle ossa pneumatizzate del massiccio facciale: i **seni paranasali**.

In un uomo adulto, in media, il volume delimitato da entrambe le fosse nasali è di 14-16 mm³, mentre l'intera superficie si estende per oltre 150 cm², dei quali una minima percentuale, sistemata nella parte più alta, tra setto e turbinato superiore, è dedicata alla **percezione olfattiva**.

L'aria esterna entra attraverso le narici, compie due conversioni a 90° e quando giunge in contatto con la mucosa nasale viene scomposta, per la particolare struttura accennata, in tre flussi distinti: il principale scivola lungo il meato medio, il secondo viene diretto sulla zona olfattoria, mentre il terzo scorre sul piano del pavimento. Il

contatto dell'aria con la mucosa consente di provvedere a: a) idratazione b) riscaldamento c) purificazione.

Il naso e le strutture che ne fanno parte subiscono delle modificazioni attraverso gli anni, dovute sia ad un rimaneggiamento delle strutture ossee, sia ad un progressivo invecchiamento dei tessuti, con perdita di elasticità e di trofismo del tessuto mucoso, che possono determinare un peggioramento nel tempo delle capacità funzionali, talora con la necessità dell'intervento di supporto della respirazione orale.

Tutte le strutture descritte sono rivestite dalla mucosa delle vie aeree che è a contatto con l'aria respirata dall'inizio alla fine del suo percorso ed entra in tutte le cavità che si aprono lungo il suo tragitto. Già tale dato fa comprendere quanto sia importante la corretta conservazione del rivestimento mucosale e quanto esso possa influire sulla respirazione in condizioni patologiche.

La **parte vestibolare** è una zona di transizione dove si assiste al progressivo modificarsi dell'epitelio squamoso in cilindrico, via via con un maggior numero di cilia. Infatti nella parte del terzo anteriore delle fosse nasali (considerando la parte compresa tra la cute del vestibolo ed un'ideale linea verticale tracciata un centimetro dietro alla testa del turbinato inferiore) si possono osservare in sequenza tre tipi di epitelio: 1) *squamoso*, 2) *stratificato* a cellule cuboidali rivestite di microvilli, 3) *pseudostratificato* colonnare con rare cellule ciliate. Nei restanti due terzi l'epitelio diventa di *tipo respiratorio*.

Il setto ha un rivestimento di circa 2 mm di spessore, che diviene di 3-5 mm a livello dei turbinati, caratterizzati dal tessuto cavernoso.

La **mucosa** delle vie respiratorie è sostanzialmente costituita da un unico strato di cellule cilindriche o prismatiche di altezza diversa, dotate di cilia vibratili (fondamentali per far procedere batteri e particolato intrappolati dal muco superficiale fin verso l'orofaringe), poggiati su una membrana basale e tra loro in contatto, così da caratterizzare l'aspetto pseudostratificato dell'epitelio. Lo spessore dell'epitelio è variabile da 30 a 60

micron . Gli stimoli flogogeni determinano la reazione sia dell'epitelio con la membrana basale che della tonaca propria connettivale (corion). Sono cinque i tipi di cellule che cooperano alla formazione del rivestimento mucosale: a) *cellule prismatiche ciliate* b) *cellule prismatiche non ciliate* c) *cellule caliciformi mucipare* (goblet cell) d) *cellule basali* e) *cellule intermedie*. Naturalmente nessuna è lì per caso, ma tutte svolgono un loro preciso ruolo nell'economia del sistema di cui sono parte.

Le **ciliate**, alte da 15 a 20 micron, sono numericamente le più numerose e sono dotate di 300 - 400 microvilli apicali, ma soprattutto di circa 100 - 250 cilia ciascuna, variabili per l'altezza (da 6 ad 8 micron) in rapporto alla sede. Le cilia si possono considerare delle propaggini di citoplasma estroflesso, con rivestimento mucosale, capaci, grazie ad un sistema di microtubuli (dieci coppie, una centrale e nove periferiche disposte in circolo, ancorate ad un corpo basale), di flettere sincronamente con un moto ondulatorio di circa 700 - 1000 oscillazioni al minuto, sospingendo il particolato ed il muco ad una velocità di 5 - 6 mm / minuto. Tutte le cilia muovono nella stessa direzione con una piccola differenza di fase: moto metacronale. Il muco è in parte il prodotto delle ghiandole sierose e sieromucose e delle goblet cells, in parte del passaggio per trasudazione dalle zone di tessuto cavernoso, ed in parte ancora della condensazione dell'aria che, giungendo dai polmoni, trova un gradiente di 3-4 C° nelle fosse nasali. Oltre il 95 % del muco è costituito da acqua, circa il 3 % da mucina, l'1-2 % da sali (essenzialmente cloruri e bicarbonati) e da minime quantità di proteine (lattoferrina, α 1 antitripsina, proteine del complemento). La mucina, comprendente sialomucina, solfomucina e fucomucina, agisce come carta moschicida per i batteri ed il particolato.

Le **non ciliate, cellule a spazzola**, sono morfologicamente simili alle ciliate, ma non posseggono cilia bensì solo microvilli, circa 500 - 1000 di 1 micron d'altezza, che hanno la funzione di espandere l'area assorbitiva e di scambio con l'ambiente esterno.

Le cellule **mucipare o goblet** sono in realtà delle ghiandole costituite da una sola cellula, capaci di liberare granuli di mucina dalla parte apicale senza discontinuità del rivestimento membranoso proprio. La densità di distribuzione va da circa 6.000 / mm² nel setto, a 8.000 nel turbinato medio, fino a 11.000 in quello inferiore. La loro produzione ed il loro numero è direttamente proporzionale allo stimolo di agenti irritanti o flogogeni. In superficie sono presenti microvilli alti meno di mezzo micron. Le cellule **basali ed intermedie** hanno forma irregolarmente triangolare, non aggettano nel lume, ma sono una popolazione di riserva deputata a rimpiazzare le cellule ciliate (vita media 20 giorni) o goblet invecchiate. Nel corso della differenziazione abbozzano strutture intermedie tra microvilli e cilia.

La **tonaca propria** della mucosa o **corion** è costituita da fasci di connettivo fibrillare lasso, interposto tra la membrana basale cellulare e la struttura periosteale o pericondrale. Nel suo contesto, oltre ai fibroblasti, trovano sede moltissimi elementi cellulari deputati alla risposta immunitaria (istiociti, linfociti e mastociti), pertanto il suo ruolo è duplice: a) trofico e di sostegno meccanico b) di risposta difensiva contro agenti nocivi.

Si possono identificare tre strati sovrapposti : 1) superiore o linfoide caratterizzato soprattutto da elementi cellulari talora stanziali (macrofagi, linfociti, plasmacellule.), sia migranti dal sangue (granulociti, linfociti, monociti..) 2) intermedio o ghiandolare con elementi tubuloalveolari mucosi, sierosi e sieromucosi, caratterizzati dalla produzione di lisozima, lattoferrina, enzimi, IgA secrete, etc. 3) profondo o vascolare, costituito dalla complessa rete capillare deputata all'apporto energetico delle varie strutture.

La grossa e diffusa rete vascolare spiega il continuo e regolare variare di spessore della mucosa nasale con le connesse implicazioni funzionali. Sinteticamente i vasi della mucosa nasale possono essere distinti in base alla funzione in a) **vasi di resistenza** (arterie, arteriole, anastomosi artero-venose) deputati alla regolazione del flusso ematico e b) **vasi di capacitanza** (venule, sinu-

soidi venosi) delegati a regolare il volume ematico.

La piena efficienza, anche immunologica, del sistema operativo si ottiene con il raggiungimento dell'età scolare. Con la senescenza invece il rivestimento epiteliale si riduce per quantità e qualità di risposta, con meno cilia e meno efficienti, meno cellule immunocompetenti residue, un minor flusso vascolare, una più scarsa resa del controllo neurovegetativo.

Nella mucosa nasale è vasta la popolazione di cellule presenti. In tale distretto, il sistema linfatico associato al tessuto mucoso può essere definito **NALT** (nasal associated lymphoid tissue). Le cellule epiteliali presenti esprimono antigeni di istocompatibilità di classe II; tra loro si riscontrano poi elementi dendritici tipo cellule di Langerhans (cellule APC professioniste), cellule M (microfold) capaci anch'esse di presentazione antigenica, linfociti T, che nella mucosa nasale normale sono prevalenti: in condizioni di non stimolazione solo una piccola percentuale esprime il IL-2 receptor. I B linfociti sono essenzialmente deputati a produrre IgAs, le quali sono secrete sulla superficie mucosa e svolgono, in forma dimerica e unite al secretory component, un'azione di blocco verso virus e batteri patogeni presenti in loco. Modeste sono le quote di altre Ig presenti, per lo più provenienti dal circolo, ma le IgE aumentano in caso di flogosi allergica.

In condizioni di non stimolazione, la mucosa nasale superficiale, quella valutabile mediante raccolta citologica, non presenta cellule della flogosi, nè elementi metacromatici (basofili), nè eosinofili. Sono invece riscontrabili sporadici neutrofili e qualche batterio, anche perchè va tenuto presente che una minima condizione di stimolo, non fosse altro che per il continuo arrivo di aria contenente particolato vario, esiste sempre a livello di una mucosa esterna.

Le condizioni cambiano nettamente in rapporto a situazioni di stimolo diverso, anche se talora rinopatie medicamentose possono non dare segni particolarmente eclatanti a livello mucosale, al di là, e non sempre, di un'incremento di cellule **goblet**, che esprimono lo stato

irritativo indotto, evidenziato clinicamente da un'abbondante secrezione più o meno acquosa. Un analogo aumento di goblet cells è riscontrabile anche nelle riniti allergiche (sia stagionali che perenni), ma accompagnato da un parallelo significativo aumento di leucociti eosinofili, e correlato comunemente con abbondante rinorrea. Nelle forme croniche, forse per la continua persistenza dello stimolo irritativo-flogogeno, il numero di goblet cells è più elevato. È riscontrabile un analogo incremento anche nelle rinopatie vasomotorie ed è stato segnalato anche nei difetti selettivi di IgA.

Un incremento anche molto spiccato di **leucociti neutrofili**, spesso capaci di formare dei piccoli monostrati cellulari, accompagna le forme acute, ricorrenti o croniche di infezioni delle alte vie aeree (rinofaringiti, rinoadenoiditi, anche più spiccato nelle rinosinusiti). In tali condizioni sono identificabili numerosi batteri, sia extracellulari che intracellulari, morfologicamente definibili (cocchi, bastoncelli, cocco-bacilli...) e caratterizzabili con l'esame colturale e le varie reazioni necessarie per l'identificazione.

Va ricordato che comunemente nelle cavità nasali risiedono senza intenzioni bellicose ceppi batterici come stafilococchi, streptococchi, pneumococchi ed altri, che in particolari situazioni, come il danno mucosale indotto da agenti virali, possono diventare patogeni. Gli stafilococchi globalmente rappresentano il 40% circa degli agenti causali di sovrainfezione batterica delle alte vie aeree, seguiti da streptococchi (15%), haemophilus influenzae (13,5%), streptococcus pneumoniae (8%), mentre la restante percentuale va ascritta a germi diversi (sia aerobi Gram+ che Gram-, sia anaerobi). Molto rare od eccezionali sono le riniti infettive batteriche propriamente dette, e riconoscono stafilococchi o germi meno comuni od eccezionali come gonococco, corynebacterium diphtheriae, mycobacterium tuberculosis.

Nelle sinusiti, dove la ristrettezza dei meati di comunicazione tende a creare "condizioni di concamerazione" virtualmente chiuse e quindi facilitanti lo sviluppo di germi, sono frequentemente riscontrabili sia

l'Haemophilus influenzae che lo Streptococcus pneumoniae nelle forme acute, ma anche anaerobi e Streptococcus viridans nelle croniche.

Le cellule ciliate infettate da virus vanno incontro a particolari alterazioni di struttura, riconoscibili con un'osservazione attenta, e caratterizzate da alcuni aspetti peculiari che vanno sequenzialmente con il procedere del danno indotto: a) progressiva marginalizzazione di masserelle di cromatina addensata, picnotica, aggregate a materiale incluso nucleare b) citoplasma che diventa sempre più granuloso c) comparsa di una sorta di alone perinucleare d) quindi la cellula si strozza al di sopra del polo superiore del nucleo e) infine la parte basale della cellula contenente il nucleo si stacca dalla parte apicale ciliata. L'insieme delle alterazioni citologiche indotte dall'infezione virale si definisce **ciliocitoforia**, ed è molto utile per riconoscere un'infezione virale da una rinite allergica.

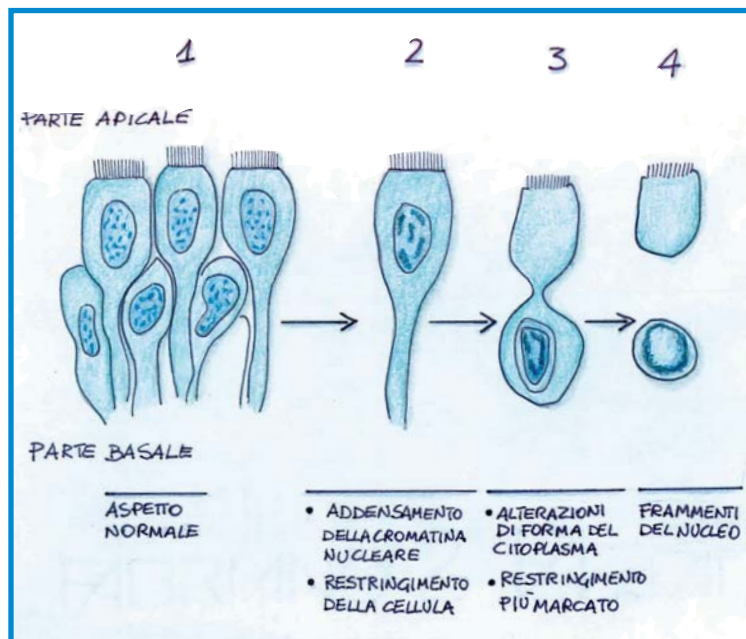


Figura 1 - Alterazioni delle cellule epiteliali della mucosa nasale in corso di infezioni virali (da Jallowayki et Al., mod.)

Comunemente non sono ravvisabili nella mucosa nasale **cellule metacromatiche**, proprietà tintoriale che caratterizza **basofili** e **mastociti**, contraddistinta dal viraggio al violetto del colorante rosso per l'interazione tra il colorante basico ed i mucopolisaccaridi solforati e le sialomucine di mastociti e basofili.

Essendo la metacromasia una proprietà comune, non è discriminante per la distinzione tra basofili e mastociti.

Mentre i mastociti sono presenti a livello delle superfici e mucose e sierose, nei tessuti linfatici e connettivali, e sono in stretto rapporto con nervi e vasi, i basofili sono essenzialmente cellule del sangue circolante e giungono nei tessuti attraverso il circolo. Basofili e mastociti derivano dall'identico precursore midollare CD34+, ed esprimono il recettore ad alta affinità per le IgE. I mastociti si distinguono in MCtc e MCt, a seconda del loro contenuto in proteasi neutre: se contengono chimasi, carbossipeptidasi e triptasi sono MCtc, se contengono solo triptasi sono MCt. La distribuzione dei due tipi di mastociti varia nei vari tessuti; nel naso si ha circa un 65% di MCt ed un 35% di MCtc. I basofili sono privi di chimasi e contengono solo minime quantità di triptasi; quando attivati rilasciano istamina e LTC₄.

Microscopicamente i basofili si contraddistinguono per le piccole dimensioni (5-6,5 μm), uno scarso numero di granuli di differenti dimensioni, un nucleo lobato collocato tendenzialmente ad un estremo della cellula, e l'addensamento di cromatina alla periferia. I mastociti sono più grandi di diametro (5-12 μm), posseggono molti piccoli granuli che talvolta si sovrappongono al nucleo ovale e disposto centralmente, nascondendolo.

Nella mucosa nasale le cellule metacromatiche sono peraltro presenti in quantità variabili tra 200-400/mm³, quasi esclusivamente localizzate nella lamina propria. In alcune forme di riniti croniche, le mastocitosi nasali, il loro numero è 10 volte maggiore. Nelle reazioni allergiche, spesso, ma non sempre in modo proporzionale all'intensità dello stimolo, si ha un cospicuo aumento di cellule metacromatiche. Pertanto aumenta la loro presenza nei soggetti pollinosici esposti al polline aller-

genico, mentre ritorna nella norma al di fuori della stagione dell'impollinazione. Il loro incremento è talora parallelo a quello dei leucociti eosinofili, che però prevalgono nelle forme a stimolo flogogeno cronico.

I leucociti eosinofili, assenti in condizioni di normalità aumentano considerevolmente nelle forme allergiche, in correlazione positiva con la sintomatologia clinica, e talora con il livello di IgE specifiche sieriche e con gli stessi eosinofili circolanti, soprattutto in caso di coin-teressamento della mucosa bronchiale e/o della cute, come nei rinitici asmatici o rinitici dermatitici atopici.

Il test di provocazione nasale specifico in soggetti sensibilizzati determina un incremento significativo all'osservazione condotta a trenta minuti (early phase), che perdura anche nella sesta e fino alla ventiquattresima ora (late phase) dopo il test, sia nei soggetti con late phase clinicamente sintomatica che in quelli clinicamente late negativi. Tale cinetica è analoga a quella di neutrofili e cellule metacromatiche fino alla sesta ora, ma queste ultime ritornano ai valori basali entro la ventiquattresima.

I soggetti con rinite allergica perenne presentano costantemente un infiltrato di leucociti eosinofili, sia pur meno intenso di quando sottoposti a stimolo specifico, a testimonianza di uno stato di flogosi minima locale persistente almeno a livello cellulare, anche in parziale o completa asintomaticità clinica. Anche in condizioni non correlabili con l'allergia sono talora riscontrabili numerosi eosinofili nella mucosa nasale. Tali situazioni vengono definite **NARES** (= non allergic rhinitis with eosinophilia syndrome), e talora sono inquadrabili come rinopatie vasomotorie, sinusiti e poliposi nasali. Gli eosinofili sembrano svolgere il ruolo di effettori del danno tissutale.

Esiste variabilità nella presenza quantitativa di eosinofili in rapporto con la sede del prelievo di materiale per l'osservazione (vedi oltre).

FISIOPATOLOGIA DELLA REAZIONE ALLERGICA

Da un punto di vista patogenetico le IgE possono essere definite come la condizione necessaria ma non sufficiente per innescare la reazione allergica; in realtà la loro identificazione permette di individuare agevolmente i soggetti cosiddetti atopici. Infatti, la prima caratteristica del soggetto atopico è quella di presentare una sintesi continuativa e persistente di IgE specifiche. Peraltro la presenza di IgE, come già visto, non è sufficiente per indurre in tutti i soggetti atopici la comparsa di manifestazioni cliniche in seguito all'esposizione all'allergene causale.

Le IgE sono sintetizzate a partire dai linfociti B, maturati in plasmacellule, sotto il controllo regolatorio di una serie di citochine rilasciate dal linfocita T. Le citochine sono dei mediatori a basso peso molecolare che svolgono un'attività localizzata in grado di modulare le funzioni cellulari. Esse possono svolgere svariati effetti sia in senso stimolatorio che inibitorio di numerose funzioni cellulari, in particolare innescano una serie di fenomeni chiave nello sviluppo della risposta infiammatoria.

Pattern citochinico nella flogosi allergica

L'infiammazione allergica è caratterizzata essenzialmente dall'infiltrato eosinofilo e dalla sua attivazione e, a livello mucosale, dal danno epiteliale e dal remodelling tessutale. Le citochine, generate sia dalle cellule residenti che dalle cellule infiltranti, sono responsabili dell'inizio e del coordinamento di questi eventi flogistici. Queste citochine possono essere sinteticamente classificate in vari gruppi: 1) quelle che iniziano la risposta infiammatoria acuta (quali l'IL1 ed il $TNF\alpha$), 2) quelle che sono responsabili dell'inizio della fase cronica dell'infiammazione (IL6 e GM-CSF),

3) quelle che reclutano le cellule infiammatorie (chemochine: IL8, RANTES, IL5), 4) quelle che regolano le cellule immunocompetenti (IL4, IL5, IL10, IL12 e IL13) ed infine 5) quelle che promuovono i processi di riparazione (TGF β , β -FGF e PGDF), (Fig. 2,3,4). Peraltro, lo spettro delle citochine generate in una definita risposta infiammatoria è univoco. Nel processo di infiammazione allergica IgE-mediata le citochine prodotte regolano lo switch della produzione anticorpale verso la sintesi di IgE, richiamano, attivano e prolungano la sopravvivenza degli eosinofili e quindi iniziano e mantengono la flogosi allergica. I linfociti Th2, grazie alla loro capacità di produrre citochine in grado di indirizzare i linfociti B verso la sintesi di IgE e di attrarre gli eosinofili, sono concordemente considerati i promotori e coordinatori dell'infiammazione allergica.

È stato sperimentalmente dimostrato che sia i mastociti murini che linee mastocitarie murine, in seguito all'attivazione del Fc ϵ RI, sintetizzano e rilasciano una serie di citochine (tra le quali IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, GM-CSF, IFN γ , TNF α , MIP, TLA3 e JE). Inoltre è stato dimostrato che pure una linea mastocitaria umana è in grado di rilasciare alcune citochine (MCP1, MIP, RANTES e IL8). Più recenti studi hanno dimostrato in vivo che mastociti polmonari sono potenziali fonti di altre citochine (quali IL3, IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, GM-CSF e TNF α).

Questi dati confermano quindi l'importanza del mastocita nel mantenimento della flogosi allergica, in quanto esso non solo è la fonte di mediatori, di enzimi e di proteoglicani ma anche di citochine. Pertanto accanto alle classiche cellule dell'infiammazione allergica (l'eosinofilo ed il linfocita T) il mastocita occupa un ruolo di primo piano nell'ambito della reazione allergica.

Le citochine che favoriscono lo switch verso l'isotipo IgE, cioè l'IL4 e l'IL13, sono prodotte da una sottopopolazione di linfociti T, caratterizzati da un profilo citochinico tipo T helper 2, mentre i linfociti T che

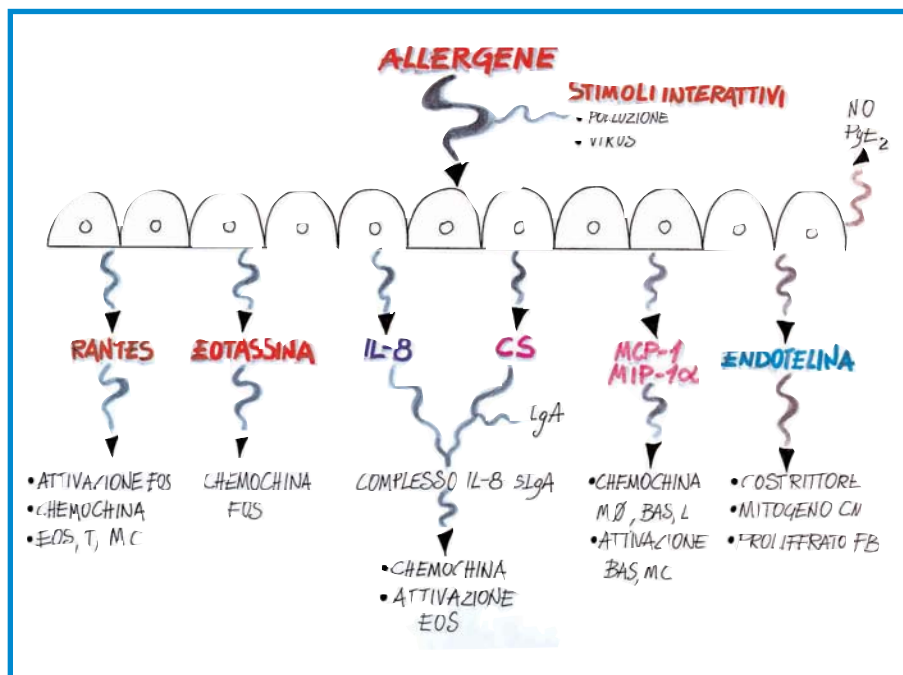


Figura 2 - Ruolo dell'epitelio nella genesi della flogosi allergica: le cellule epiteliali sono in grado di rilasciare vari mediatori che svolgono un ruolo attivo nei vari processi e conducono al richiamo di cellule infiammatorie ed allo sviluppo di sintomi clinici.

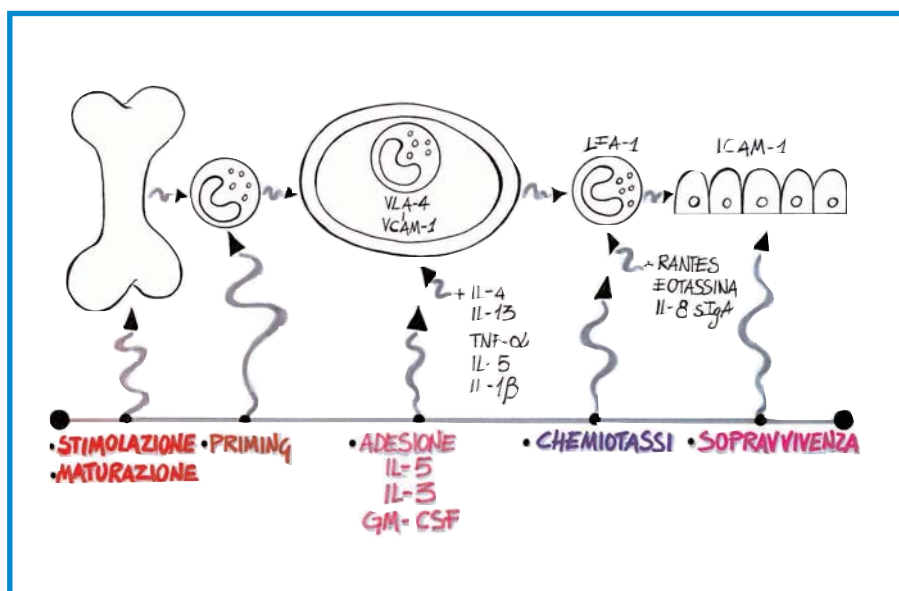


Figura 3 - Processi coinvolti nel richiamo e nella permanenza mucosale degli eosinofili: in seguito all'esposizione allergenica si assiste ad un rilascio di IL5, IL3 e GM-CSF che stimolano il midollo osseo a immettere in circolo elementi maturi e progenitori degli eosinofili, in circolo avviene un priming per il successivo effetto chemiotattico; altre citochine favoriscono l'adesione all'endotelio nella sede della reazione allergica, le chemochine inducono la migrazione attraverso la matrice per determinare l'infiltrazione mucosale; infine IL5, IL3 e GM-CSF ne aumentano la sopravvivenza.

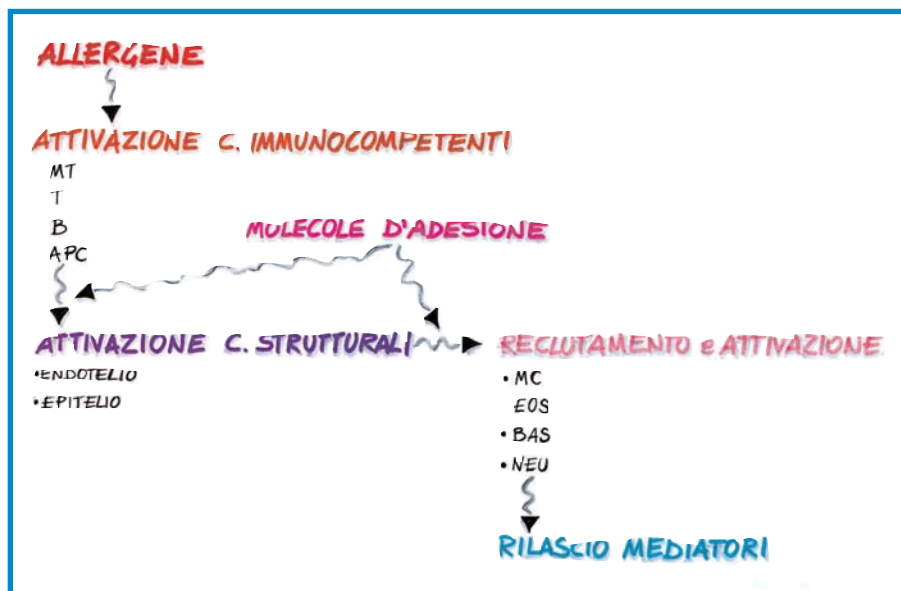


Figura 4 - Schema che illustra la progressione dinamica della reazione allergica a livello delle vie aeree a partire dall'esposizione all'allergene, seguita dall'attivazione delle cellule immunocompetenti, che inducono un'attivazione delle cellule strutturali, coinvolte nel processo flogistico; le cellule infiammatorie richiamate a livello mucosale attraverso i meccanismi di adesione sono in stato di attivazione e rilasciano così i vari mediatori.

producono un profilo di citochine tipo T helper 1, secernendo IFN gamma, esercitano un effetto inibitorio sullo switch isotipo specifico per la sintesi di IgE (Fig. 5). Le cellule Th1 e Th2 si inibiscono reciprocamente. Nel soggetto atopico la sintesi di IgE è incrementata, in quanto ci sarebbe uno squilibrio tra le funzioni regolatorie dei Th1 e Th2. Lo sviluppo dei linfociti Th2 richiede la presenza di IL4. L'IL4 svolge un ruolo fondamentale durante la gravidanza, in quanto essa è sintetizzata dalla placenta per prevenire il rigetto immunologico, che è un meccanismo Th1-dipendente, nei confronti del feto. E' stato ipotizzato che la persistenza di questa preponderanza di risposta orientata in senso Th2, favorita da migliorati schemi nutrizionali e da più idonee condizioni igieniche (riduzione delle malattie infettive) e quindi in mancanza di un controsegnale Th1, sia il più importante fattore che ha contribuito all'incremento della prevalenza delle malattie allergiche in questi ultimi 40 anni.

Mediante gli studi bioptici è stato possibile dimostrare un accumulo di cellule effettrici a livello epiteliale, in particolare di mastociti, eosinofili e basofili (Fig. 6). L'accumulo di cellule infiammatorie a livello epiteliale è responsabile del cosiddetto fenomeno di "priming", che si verifica nei soggetti affetti da rinite allergica stagionale, caratterizzato dal fatto che a parità di concentrazioni polliniche i sintomi sono più intensi verso la fine della stagione rispetto all'inizio. I linfociti T tendono ad infiltrare gli strati più profondi della mucosa. Il rilascio di citochine e chemochine da parte di linfociti T, mastociti e cellule epiteliali è responsabile del richiamo di cellule infiammatorie a livello mucosale. Per quanto concerne l'attivazione dei linfociti T, è indispensabile una interazione specifica tra un linfocita T ed una cellula presentante l'antigene, che cioè processi l'allergene e lo presenti in forma modificata alla cellula T. Le cellule dendritiche e le cellule di Langherans sono le più importanti cellule presentanti l'antigene rilevabili a livello mucosale durante la reazione allergica; inoltre esse esprimono

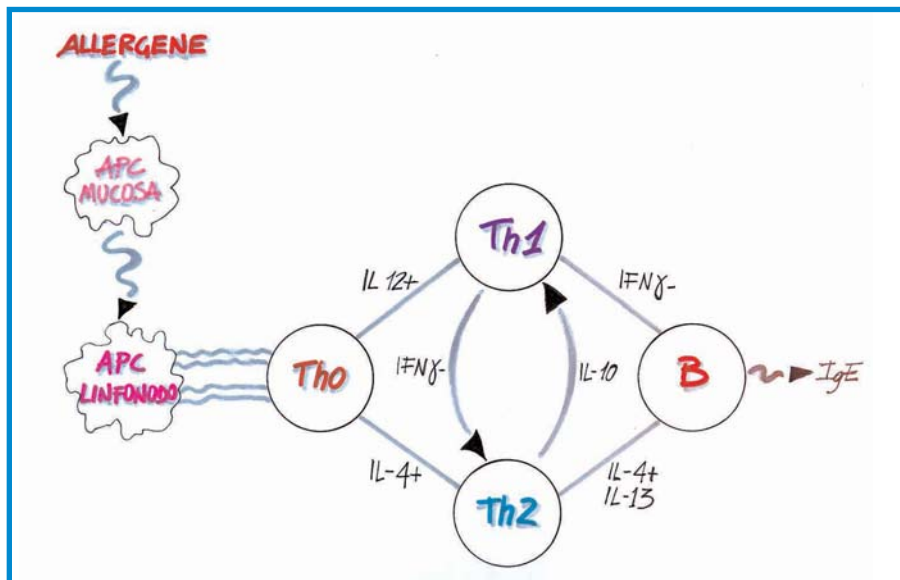
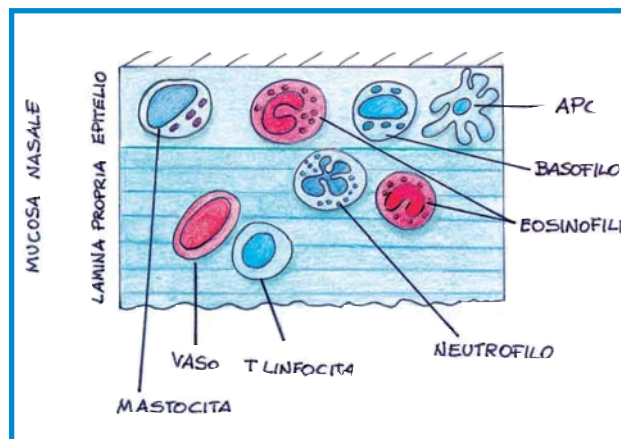


Figura 5 - Regolazione della sintesi delle IgE da parte dei linfociti T. Le cellule T con profilo citochinico Th2 determinano un incremento della sintesi di IL4 e IL13, favorendo lo switch isotipico delle IgE, mentre lo sviluppo delle cellule T con profilo citochinico Th1, caratterizzato dal rilascio di IFN gamma, inibisce lo switch delle cellule B verso la sintesi di IgE. Questo processo coinvolge anche la presentazione antigenica e la processazione da parte delle cellule dendritiche mucosali (di solito rappresentate a livello delle vie aeree dalle cellule di Langherans) ed in seguito la presentazione dell'antigene, in forma modificata, ai linfociti T, che avviene solitamente a livello dei linfonodi drenanti.

Figura 6 - Modificazioni morfologiche degli stipi cellulari nella rinite allergica: è presente un infiltrato a livello epiteliale ad opera delle principali cellule effettrici della reazione allergica (mastociti, basofili ed eosinofili) e delle cellule presentanti l'antigene (cellule di Langherans); a livello della sottomucosa invece è presente un infiltrato rappresentato dagli eosinofili, dai linfociti e dai neutrofilo.



l'FcεRI. Le citochine rilasciate dal Th2 promuovono il richiamo di eosinofili a livello delle vie aeree mediante un'attivazione endoteliale e quindi un'aumentata aderenza leucocitaria all'endotelio vascolare. I meccanismi con cui queste citochine Th2 inducono l'accumulo di eosinofili possono essere riassunti in: 1) un incremento della risposta chemiotattica degli eosinofili alle chemochine, 2) una stimolazione del midollo osseo a produrre cellule progenitrici, 3) l'espressione di specifiche molecole d'adesione sia a livello endoteliale che epiteliale, 4) un'aumento della loro sopravvivenza, mediante l'inibizione del fenomeno dell'apoptosi. Il movimento delle cellule infiammatorie diretto verso la mucosa è regolato dal rilascio di chemochine da parte delle cellule epiteliali. Le cellule epiteliali rappresentano infatti la prima barriera mucosale nei confronti dell'ambiente esterno; il loro ruolo nella genesi della reazione allergica è supportato dal fatto che svariati fattori ambientali, quali gli agenti inquinanti e le infezioni virali, sono in grado di attivarle. Una dimostrazione indiretta dell'attivazione epiteliale ad opera di agenti inquinanti viene fornita dall'aumentata concentrazione di ossido nitrico esalata che si osserva nei soggetti allergici esposti ad alti livelli di inquinanti.

Pattern delle molecole d'adesione nella reazione allergica

Le molecole d'adesione sono proteine espresse sulla superficie delle cellule; la loro espressione può essere costitutiva o indotta da adeguati stimoli. Esse svolgono un ruolo fondamentale nel reclutamento di cellule infiammatorie in corso di reazione allergica. In particolare esse sono responsabili della selezione di specifici stipiti cellulari. Infatti l'espressione endoteliale di VCAM-1 riconosce come specifico ligando VLA-4 espresso unicamente sugli eosinofili: pertanto in questa maniera solo gli eosinofili possono attraversare la barriera endoteliale. Un'altra molecola molto importante nello sviluppo della flogosi allergica è

ICAM-1. Essa viene espressa dall'epitelio solo dai soggetti allergici e unicamente in seguito all'esposizione all'allergene causale: infatti sia i soggetti normali che i pollinosici al di fuori della pollinazione non esprimono ICAM-1 sulle loro cellule epiteliali. L'espressione di ICAM-1 a livello epiteliale può pertanto essere considerata un marker di flogosi allergica. ICAM-1 giustifica l'infiltrazione leucocitaria mucosale, in quanto è il ligando di LFA-1 e di Mac1, che sono integrine espresse dai leucociti. Inoltre ICAM-1 è il recettore principale dei rinovirus, per cui il soggetto allergico agli acari, che presenta una situazione di flogosi minima persistente, caratterizzata cioè dall'espressione di ICAM-1, è più suscettibile di contrarre un'infezione da rinovirus. In particolare le infezioni da rinovirus sono correlate agli attacchi d'asma, per cui si può ipotizzare la correlazione fisiopatologica tra esposizione allergenica, flogosi allergica, infezioni virali ed esacerbazioni asmatiche.

CITOLOGIA NASALE

L'analisi della citologia nasale consente di acquisire preziose informazioni concernenti la fisiopatologia della flogosi allergica e la risposta all'eventuale terapia instaurata.

Verranno discusse le indicazioni, le tecniche di prelievo, le metodologie di colorazione, la presentazione dei risultati ottenuti e la loro interpretazione nelle varie patologie.

Indicazioni

La gestione del paziente che riferisce sintomi nasali verte eminentemente su un corretto approccio diagnostico, che è il presupposto cardine per l'impostazione di una razionale ed adeguata strategia terapeutica.

L'analisi della citologia nasale si inserisce opportunamente nell'iter diagnostico, in quanto permette di ottenere utili dati in merito alla diagnosi differenziale e al decorso della patologia, che si aggiungono ai rilievi forniti dalla storia clinica ed ai reperti obiettivi.

Le indicazioni principali di questa metodica possono essere sinteticamente riassunte:

Cliniche=

- 1) distinzione tra rinopatie infiammatorie e non-infiammatorie;
- 2) distinzione delle riniti in forme allergiche, non-allergiche ed infettive;
- 3) distinzione delle forme infettive in batteriche, virali e fungine;
- 4) classificazione degli stipiti cellulari coinvolti nella risposta immune ad un patogeno;

-
- 5) ottenimento rapido dell'identificazione del genere del patogeno causale;
 - 6) valutare la morfologia delle cellule epiteliali e la condizione delle strutture ciliari;
 - 7) identificazione e conta nelle forme allergiche delle cellule epiteliali e delle varie cellule infiammatorie (eosinofili, neutrofilo, cellule metacromatiche (basofili e mastociti), cellule mononucleate);
 - 8) valutazione nel tempo dell'andamento del processo flogistico;
 - 9) valutazione del grado di risposta al trattamento prescritto.

Sperimentali=

- 1) individuazione di uno stato di flogosi anche in assenza di sintomi;
- 2) verificare l'effetto dell'allontanamento dell'allergene causale sulla flogosi;
- 3) valutazione dell'attività antiinfiammatoria di un farmaco;
- 4) valutazione dell'attività antiinfiammatoria dell'immunoterapia specifica;
- 5) applicazioni di immunocitochimica e di biologia molecolare per studiare la fisiopatologia della flogosi allergica.

METODOLOGIA

Materiali indispensabili

La valutazione della citologia nasale è effettuabile con l'utilizzo di pochi strumenti e di relativamente basso costo, in rapporto alla quantità e qualità di informazioni che può fornire, se ben impiegata.

Sinteticamente si deve disporre:

- a) di una fonte luminosa (di una pila, in caso di disponibilità di un'infermiera che possa orientarla, oppure di una lampada da otorinolaringoiatria).
- b) alcuni "specula" nasali di differenti dimensioni per divaricare le narici in rapporto alle diverse esigenze anatomiche.
- c) un tampone od un altro oggetto adatto per la raccolta del materiale (vedi oltre).
- d) alcuni vetrini da microscopio a banda smerigliata oppure vetrini con pozzetti circolari per la deposizione del materiale.
- e) una matita e delle etichette adesive.
- f) un fissatore per citologia, p.e. alcool etilico 95%.
- g) coloranti per colorazioni citologiche: Wright-Giemsa, blu di toluidina, ematossilina eosina, ecc.
- h) guanti monouso di lattice od altro materiale.

Materiali facoltativi

i) provettoni ad imbocco largo e graduati, in caso di esecuzione di lavaggi nasali.

l) se si desidera eseguire determinazioni virologiche: un mezzo di trasporto virologico e del ghiaccio.

METODI DI RACCOLTA

Per ottenere campioni idonei di materiale citologico nasale si possono utilizzare diverse tecniche, da scegliere tenendo conto di alcuni fattori condizionanti,

quali: età del paziente e conseguente grado di collaborazione, punto più superficiale o più profondo della mucosa che interessa studiare, eventuale necessità di sviluppare anche valutazioni biochimiche (dosaggi di mediatori, applicazioni immunocitochimiche).

Le tecniche migliori sono quelle che consentono di valutare sia le cellule sfaldate nel muco che la cellularità della mucosa superficiale, ma talora i pazienti possono essere disturbati dall'utilizzo delle spatoline utilizzate per la raccolta. È necessario assicurare sempre il paziente dell'innocuità dei prelievi; che non si procurano sanguinamenti nè traumatismi, ma che frequentemente si potrà avvertire prurito nasale, un lieve dolore con lacrimazione e starnutazione, di brevissima durata. È opportuno prima di eseguire il prelievo, invitare il paziente ad eliminare l'eventuale eccesso di secrezione, o soffiando il naso o aspirando il muco con una siringa priva dell'ago.

I diversi metodi di raccolta del campione si possono riassumere come segue:

a) per **raccolta di muco soffiato** dal paziente su un foglio di carta paraffinata o di plastica sottile, che consenta di raccogliere il materiale espulso e trasportarlo su vetrino da microscopio. Si ha grande variabilità da campione a campione, ma si ha comunque la possibilità di determinare la presenza o l'assenza di una determinata popolazione cellulare. Si valutano solo le cellule sfaldate nel muco e talora i pazienti non riescono a produrre una quantità di materiale sufficiente.

b) Per raccolta con **tamponcino di cotone**: consente, inserendo il tamponcino nella mucosa nasale e ruotandolo delicatamente sulla zona interessata, di far aderire tra le fibre del cotone le cellule sfaldate o semisfaldate, e quindi con minimo disagio per il paziente di ottenere del materiale adatto alla valutazione delle diverse popolazioni presenti sia in termini relativi, che in rapporto alla totalità cellulare.

Ha limiti di ripetibilità e, in caso di muco abbondante,

questo tende ad intrappolare le cellule, che anche dopo la deposizione sul vetrino, rimangono deformate e talora poco distinguibili. Può essere sensibilmente migliorato immergendo dopo la raccolta il tamponcino in 2 ml di PBS per alcuni minuti, onde far eluire le cellule nel mezzo liquido. Successivamente si dovrà procedere a filtrazione e centrifugazione prima del posizionamento su vetrino.

c) per **impronta**: si utilizzano sottili strisce di carta imbibite di una soluzione di albumina all'1%, in modo da renderle appiccicose ed idonee ad incollare le cellule una volta inserite nelle narici e leggermente premute sulle pareti (in genere il setto). Non è facile da eseguire, dovendo utilizzare i guanti di lattice, con le striscioline che tendono ad arrotolarsi appiccicandosi, ed inoltre, se la rinorrea è abbondante, la striscia può imbibirsi troppo.

d) per "**brushing**" o spazzolamento: si utilizzano le spatoline con minuscole setole di nylon che vengono fatte ruotare delicatamente tra il turbinato inferiore ed il setto. Si possono raccogliere sia cellule delle secrezioni che della mucosa superficiale.

La raccolta fornisce campioni adatti soprattutto per lo studio morfologico, ma anche per quello biochimico. Il paziente può avvertire qualche fastidio durante la rotazione della spatolina.

e) per "**scraping**" o raschiamento: mediante idonee curette di plastica (Rhino-Probe®, Apotex Scientific, Arlington, Texas) e sotto controllo visivo si possono ottenere buoni campionamenti con un leggero e pressochè atraumatico raschiamento della superficie mucosale del terzo medio del turbinato inferiore. Il paziente prova minimo fastidio, ma in compenso il campione raccolto è di norma abbondante, ben ripetibile, e la quantità di cellule è adeguata sia alla valutazione citologica, sia all'eventuale impiego di tecniche immunocitochimiche e virologiche. Non è adatto alla valutazione degli strati meno superficiali di mucosa.

f) per **lavaggio nasale**: il paziente deve essere molto collaborativo e va istruito sulla necessità di mantene-

re il collo lievemente piegato all'indietro, di non respirare durante l'esecuzione del lavaggio, non inghiottire la soluzione, mantenendo la glottide chiusa, e lasciando refluire il liquido di ritorno nel provettone di raccolta, inclinando la testa in avanti dopo l'introduzione della soluzione salina. La quantità di soluzione salina utilizzata è di 5ml per ogni lavaggio. Il materiale raccolto è a volume noto, per cui è possibile 1) contare le cellule in un "counter" 2) allestire dei cytopspin (800-1000 giri per cinque minuti) per valutazioni morfologiche ed immunocitochimiche 3) eseguire dei preparati per ricerche virologiche.

A fronte di una certa indaginosità della raccolta, il materiale è molto più pulito, in quanto il muco viene separato dalla centrifugazione e dalla filtrazione e le cellule sono abbondanti, ben conservate e con una distribuzione indipendente dalle modalità di strisciamento sul vetrino. È anche un ottimo mezzo per lo studio biochimico dei mediatori e delle citochine.

g) **biopsia**: normalmente si esegue al bordo inferiore del turbinato inferiore. È necessario conoscere il punto esatto di prelievo, data la variabilità del tipo di epitelio in rapporto alle varie zone della cavità nasale. Necessita di anestesia e talora dell'impiego di un vasocostrittore, quindi è poco ripetibile ed abbastanza fastidioso per il paziente. Il grande vantaggio è che consente di valutare non solo la zona mucosale superficiale, ma anche la membrana basale e la sottomucosa. (Tab. 3)

PROCEDURE

Prima di procedere al prelievo del materiale citologico, che, ad eccezione di quello bioptico, non richiede anestesia, è necessario, come già detto a) tranquillizzare il paziente sullo scarso fastidio del test b) eliminare l'eventuale eccesso di secrezione c) far appoggiare la nuca su di un piano posto alle spalle

del paziente, in modo da poter vedere bene le cavità nasali, eventualmente ruotando il capo nella direzione più opportuna. Nel caso del lavaggio nasale però, la sistemazione del capo deve essere accompagnata dalla raccomandazione di tenere chiusa la glottide durante l'insufflazione del liquido e di reclinare in avanti il capo qualche secondo dopo, per consentire la fuoriuscita del liquido stesso e la sua raccolta nell'apposito provettone d) in caso di difficoltà a visualizzare l'interno delle narici, è possibile aiutarsi con uno speculum di idonee dimensioni e contemporaneamente illuminare la cavità con una luce. In genere nei bambini e nei ragazzi più piccoli, se è necessario talora farsi aiutare a tenere il capo fermo da un'infermiera, non è però quasi mai indispensabile utilizzare lo speculum, ma è sufficiente sollevare in alto e lateralmente l'ala del naso della narice prescelta tenendola stirata con delicatezza e procedere al prelievo. L'utilizzo dello speculum deve essere accorto, per evitare di traumatizzare le pareti della cavità nasale del paziente, o per evitare di coprirsi la visuale del punto da prelevare e) localizzata con sicurezza la zona interessata, comunemente **la mucosa del terzo medio del turbinato inferiore**, si può inserire la curette o il tampone o il Rhino-Probe[®], per circa due - tre cm all'interno della cavità e con un leggero raschiamento della superficie mucosa, raccogliere il materiale. È opportuno eseguire tre raccolte, utilizzando, se possibile, entrambe le cavità nasali.

Il materiale raccolto deve quindi essere deposto sul vetrino, senza comprimerlo nè strisciarlo con forza per non danneggiare le cellule, ma distendendolo in maniera uniforme sul centro del vetrino o, in caso di vetrini con i pozzetti circolari già segnati, all'interno dei pozzetti. Volendo però eseguire dei preparati per cytopspin (e non volendo o potendo eseguire il lavaggio nasale), è necessario immergere la curette utilizzata per 3 minuti in 2 ml di PBS, al fine di lasciare eluire le cellule e mandarle in sospensione nel liquido, che deve poi essere filtrato e centrifugato (800 - 1000 X

g per 5 minuti), in modo da allestire i vetrini che saranno quindi colorati e poi letti per la citologia o sviluppati per le ricerche virologiche o immunocitochimiche.

Può sembrare banale, ma quando si hanno diversi campioni è importante la raccomandazione di segnare a matita sulla parte smerigliata del vetrino il nome e quanto altro interessi del paziente, per evitare di confondere i vetrini successivamente. Le etichette possono essere utilizzate dopo la colorazione per l'eventuale archiviazione, perchè altrimenti potrebbero macchiarsi e non risultare più leggibili dopo l'applicazione del colorante.

Prima di procedere con la colorazione è necessario **fissare il materiale**, utilizzando una delle diverse opzioni a disposizione. È anche possibile lasciare asciugare il vetrino all'aria, e tale procedura va bene per l'immunocitochimica, che potrà essere sviluppata dopo la necessaria reidratazione, ma non è raccomandabile per le colorazioni citologiche. Per fissare le cellule si possono utilizzare: acetone, lacca fissante per preparazioni citologiche, metanolo, etanolo (95%). La nostra esperienza ha fornito ottimi risultati sia con il metanolo che con l'alcol etilico. I preparati vanno immersi per 3 - 5 minuti, per ottenere un'ottimale fissazione. I vetrini tolti dall'alcol vanno scolati per eliminare l'eccesso di liquido raccolto.

Le **colorazioni** eseguibili sono diverse, e si possono scegliere in base all'esperienza personale o alla necessità di mettere in evidenza un tipo di cellula piuttosto di un altro. Gli eosinofili infatti si possono evidenziare meglio utilizzando Hansel, Leishman, Randolph, ematossilina eosina, le cellule metacromatiche risultano evidenziate da blu di toluidina, alcian yellow, alcian blue, le epiteliali dal Papanicolau, i neutrofili dal Wright-Giemsa e May-Grunwald Giemsa. La più rapida e semplice è la Wright-Giemsa, che consiste nell'immergere nel colorante per 20 '' - 30'' i vetrini, eliminare l'eccesso di colorante ed immergerli in un tampone a pH 6.4 - 6.8. I

vetrini devono essere quindi lavati con soluzione di lavaggio o con acqua distillata o anche con acqua di fonte. Nel caso siano più d'uno è opportuno utilizzare gli appositi contenitori scanalati per eseguire tutti i vari passaggi e lasciarli poi asciugare all'aria completamente. Esistono in commercio dei kit coloranti che contengono tutto il materiale necessario .

Noi utilizziamo comunemente tre vetrini, ciascuno colorato diversamente per ottimizzare le qualità dei coloranti impiegati, nell'evidenziare le varie cellule : May-Grunwald Giemsa, blu di toluidina ed ematossilina eosina.

a) **May-Grunwald Giemsa** : i vetrini fissati vengono immersi per 5 minuti in May-Grunwald, 20'-25' nel Giemsa (diluito al 10%), quindi lavati con acqua di fonte, asciugati e letti.

b) **Blu di toluidina** : i vetrini fissati vengono immersi per 1' in Blu di toluidina 1 : 100 (pH 2.5), lavati, lasciati asciugare e letti.

c) **ematossilina eosina** : i vetrini opportunamente preparati mediante passaggi successivi in alcol assoluto, alcol 95°, alcol 80°, vengono colorati utilizzando l'ematossilina di Mayer e l'eosina.

Volendo condurre osservazioni più particolareggiate sulle cellule epiteliali è opportuno eseguire la colorazione di Papanicolau.

PROSPETTO RIASSUNTIVO SINTETICO

- 1) scelta del metodo di raccolta e preparazione del materiale necessario
- 2) prelievo del materiale citologico e deposizione sui vetrini (preferibilmente 3 *)
- 3) fissaggio opportuno
- 4) colorazione prescelta (preferibilmente 3 diverse, una per ciascun vetrino)
- 5) lettura dei vetrini
- 6) refertazione del rinocitogramma : quantitativa,

semiquantitativa con grado di flogosi ed eventuali osservazioni utili

* sono richiesti altri vetrini (2 - 3) se si desidera eseguire valutazioni immunocitochimiche

ASPETTI PARTICOLARI

Nel caso si desideri procedere all'identificazione virologica mediante immunofluorescenza, un tamponcino, dopo il prelievo di materiale, va immerso immediatamente nel liquido di trasporto virologico e quindi mantenuto in ghiaccio fino al momento della processazione del campione.

Esistono in commercio alcuni kit diagnostici per screening rapido, che consentono lo screening e l'identificazione di virus influenzali, parainflenzali, adeno e virus respiratorio sinciziale.

Tab. n°3 - Metodi di raccolta del materiale citologico nasale e popolazioni di cellule valutabili in rapporto al metodo.

METODO	Cellule epiteliali ciliate	Cellule goblet	Neutrofili	Eosinofili	Cellule metacromatiche	sottomucosa	Batteri
a) secrezione nasale per soffiamento	---	---	+++	++-	+--	---	++-
b) scraping	+++	+++	+++	+++	++-	---	+++
c) biopsia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(Da: Meltzer e Jalowayski: Nasal Cytology in Clinical Practice, mod.)

COMMENTI

a) la secrezione nasale raccolta per soffiamento è semplice, affatto traumatica, ma consente di valutare solo alcuni tipi di cellule, senza rapporto tra le popolazioni presenti, frequentemente conglobate con cellule morte e tralci di muco. Se la secrezione è molto acquosa la quantità esaminabile può essere

insufficiente e di sicuro non è rapportabile alla realtà locale.

b) è abbastanza semplice, ma richiede una minima pratica ed una scelta idonea del materiale usato per il prelievo. Consente una buona visualizzazione delle cellule presenti, tranne quelle della sottomucosa, è ripetibile e, se ben eseguito, di minimo traumatismo per il paziente.

c) consente la massima possibilità di valutare le popolazioni cellulari della mucosa nasale nella loro interezza, ma è necessaria l'anestesia, è abbastanza traumatica e richiede un certo grado di addestramento.

LIMITAZIONI DEL PRELIEVO

Il punto migliore per eseguire la raccolta di materiale citologico è il terzo medio del turbinato inferiore, che consente di valutare sia le cellule epiteliali che l'eventuale infiltrato flogistico (eosinofili, neutrofili, cellule metacromatiche). Il bulbo anteriore del turbinato inferiore determina una raccolta inadatta per scarsità in eosinofili (come sul setto), che sono invece molto più abbondanti della distribuzione reale, se la raccolta viene condotta sul turbinato medio. Il prelievo sul turbinato superiore è fastidioso, per possibili riflessi naso cardiaci, mentre sul setto è rischioso per possibili sanguinamenti

LETTURA MICROSCOPICA

È opportuno leggere tutti e tre i vetrini colorati. Per una corretta valutazione si deve dapprima eseguire un'osservazione globale del vetrino utilizzando l'obbiettivo a piccolo ingrandimento (10 x) al fine di localizzare le zone più correttamente distribuite, l'adeguatezza della colorazione e l'eventuale presenza di artefatti da prelievo o/e da colorazione. Quindi si deve procedere alla limitazione del campo di lettura con la successiva osservazione a 25 e 40 x .

a) Lettura quantitativa

Stabilita la sede di osservazione e di conteggio, va posta una goccia di olio da immersione sulla zona del vetrino prescelta e con l'obbiettivo ad alto ingrandimento (100 x) vanno valutate con attenzione e con-

tate tutte le cellule presenti in ciascun campo. Al termine della lettura di dieci campi va riportata la media delle cellule identificate per ciascuna popolazione. Se l'osservazione è stata condotta per dieci campi su tre vetrini è necessario dividere per 3 il numero medio di cellule riscontrate. P.e. : (86 : 10) 8.6 neutrofili nel primo vetrino, (45 : 10) 4.5 nel secondo, (64 : 10) 6.4 nel terzo, daranno un valore di $19.5 : 3 = 6.5$. Volendo si può esprimere la percentuale di una popolazione cellulare rispetto ad un'altra (eosinofili su neutrofili) o rispetto al totale delle cellule contate.

b) Lettura semiquantitativa e grado dell'infiltrato

È opportuno inoltre completare l'osservazione riportando anche il dato semiquantitativo ed il grado di flogosi, che è in fondo un giudizio sul tipo di infiltrato eventualmente presente, avvalendosi delle tabelle riportate (Tab.4 e Tab.5). È però corretto riportare distinti i leucociti neutrofili dagli eosinofili (anche se poi si considerano insieme nella somma). Inoltre è idoneo aggiungere le osservazioni complementari che possono dare un contributo diagnostico : presenza di batteri intracellulari, morfologia batterica (cocchi o bastoncelli), valutazione batterica semiquantitativa : rari, alcuni, numerosi, tappeto ..., presenza di tralci di muco, alterazioni cellulari, possibili artefatti. (Tab.6 e Tab.7) Nell'esprimere il giudizio va tenuto conto (e quindi al momento del prelievo è necessario porre alcune domande al paziente):

- a) dell'eventuale allergia e della stagione in cui si esegue il prelievo
- b) della sintomatologia in atto
- c) dell'eventuale terapia in corso : topica o sistemica, steroidea e/o antiH1; con vasocostrittori topici; regolarmente o sporadicamente; se si è effettuata (e da quando si è sospesa) o se si sta ancora effettuando terapia antibiotica .

Con l'intento di rendere più rapida ed accurata e

meglio standardizzata la raccolta dei dati clinici utili, noi ci serviamo di una scheda predisposta allo scopo (Tab.8).

Il sospetto di una eventuale patologia neoplastica richiede la consulenza del citopatologo.

Tab. n°4 - Linee guida interpretative del rinocitogramma.

POPOLAZIONE CELLULARE	INDICAZIONE CLINICA
Incremento di leucociti eosinofili (grado da 1+ a 4+)	<ul style="list-style-type: none"> • Rinite allergica • NARES (non allergic rhinitis with eosinophilia) • ASA intolleranza
Incremento di leucociti neutrofilii (grado da 1+ a 4+)	<ul style="list-style-type: none"> • IVAS ° (infezione delle vie aeree superiori : rinofaringite, adenoidite, rinosinusite) • rinite su base irritativa (polveri, farmaci) , se senza batteri evidenziabili
Incremento di cellule metacromatiche (grado da 1+ a 4+)	<ul style="list-style-type: none"> • Allergia • NARES • ASA intolleranza • Rinite basofila non allergica , mastocitosi nasale

(Da: Meltzer e Jalowsky: Nasal Cytology in Clinical Practice, mod.)

° Nel contesto delle IVAS è utile, se possibile, discriminare in base all'osservazione la presenza di :

- 1) batteri prevalentemente extracellulari od intracellulari.
- 2) miceti e/o ife miceliali
- 3) alterazioni morfologiche delle cellule epiteliali (ciliocitoforia) che depongono per un'eziologia virale.

Tab. n°5 - Rinocitogramma: parametri di conteggio quantitativo-semiquantitativo-grado.

ANALISI QUANTITATIVA	ANALISI SEMIQUANTITATIVA	GRADO
NEUTROFILI e EOSINOFILI		
0 *	nessuno	0
0.1-1.0 *	sporadici elementi	1/2 +
1.1-5.0*	poche cellule sparse o piccoli gruppi	1+
5.1-15.0*	discreto numero di cellule o gruppi più grandi	2+
15.1-20.0*	grossi ammassi cellulari che non coprono interamente il campo microscopico	3+
>20.0*	grossi ammassi cellulari che coprono interamente il campo microscopico	4+
CELLULE METACROMATICHE		
0*	nessuna cellula metacromatica visibile	0
0-1-0.3*	sporadiche cellule	1/2+
0.4-1.0*	poche cellule sparse	1+
1.1-3.0*	discreto numero di cellule	2+
3.1-6.0*	molte cellule facilmente visibili	3+
>6*	numerose cellule, anche > 25 / campo	4+
CELLULE CALICIFORMI (GOBLET)**		
0 -10	nessuna cellula evidenziabile	0
11-24%	da rare a poche cellule	1+
25-49%	discreto numero di cellule	2+
50-74%	molte cellule ben visibili	3+
75-100%	moltissime cellule sparse su tutto il campo	4+
CELLULE EPITELIALI		
Valutare ed indicare : a) morfologia normale (N) b) morfologia alterata (A) c) evidenza di cilioctoforia (C)		

(Da: Meltzer e Jalowayski, mod.)

* = media di cellule per 10 campi ad alto ingrandimento (100 X)

** = rapporto cellule caliciformi / cellule epiteliali x100

Tab. n°6 - Possibili problemi di interpretazione.

- a) materiale scarso : può dipendere da inadeguato prelievo o inadeguato fissaggio del materiale. Il prelievo va ripetuto.
- b) materiale mal colorato : inadeguatezza della qualità del colorante o del tempo di colorazione . Provare a ripetere la colorazione.
- c) cellule indistinguibili, affastellate : inadeguatezza dello strisciamento del materiale, eccesso di muco denso. Si deve ripetere il prelievo.
- d) presenza di masserelle di cristalli o di frustoli di colorante che coprono la visione : controllare il colorante, provare a filtrare od eventualmente rifare la preparazione.
- e) citoplasma dei neutrofilii colorato in rosso - rosa : inadeguata colorazione . Provare a ripetere i passaggi.
- f) presenza di molte cellule squamose : raccolta del materiale troppo anteriormente o contaminazione con la zona vestibolare nel momento del recupero. Ripetere il prelievo in sede corretta.

Tab. n°7 - Note essenziali per l'identificazione delle cellule riscontrabili nel materiale citologico nasale.

- a) cellule epiteliali della mucosa nasale : sono quantitativamente le più numerose, di solito, a meno che non vi sia un grosso infiltrato di cellule infiammatorie. Possono essere di cinque tipi diversi (vedi testo), ma semplificando, se si è eseguita la colorazione con May - Grunwald Giemsa si presentano di colore celeste, con il nucleo blu scuro, e nel tipo ciliato, le ciglia sono ben apprezzabili, se non alterate dalla patologia o dal prelievo. Insieme alle goblet ed a qualche sporadico neutrofilo sono gli unici elementi cellulari riscontrabili in un prelievo di mucosa superficiale nasale in assenza di stimolazione.
- b) le cellule goblet appaiono schiumose, con il nucleo raccolto nella parte basale ed i vacuoli vuoti di mucina rendono la parte soprastante irregolarmente trabecolata. Si definiscono anche caliciformi mucipare. Appaiono celesti con MGG, blu con BT e rossicce con EE.
- c) cellule metacromatiche : presentano morfologia talora tondeggiante, talora fusiforme, con il nucleo spesso coperto da grossolani granuli di color violetto alla colorazione con BT . Talora si notano solo vestigia della membrana, mentre i granuli fuoriusciti sono dispersi all'intorno.
- d) eosinofili : presentano morfologia identica a quella visibile nello striscio ematico periferico, con nucleo in genere bilobato (ad occhiali) e fini granuli rossi, ben evidenziabili con l'eosina, talora dispersi intorno alle cellule parzialmente degranulate, talora sparsi finemente nel citoplasma.
- e) neutrofilii : di aspetto simile a quelli visibili negli strisci ematici, si colorano molto bene con MGG in blu, con citoplasma azzurro chiaro e nucleo più o meno polilobato blu scuro.
- f) linfociti e monociti appaiono simili a quelli ematici. I primi si riscontrano più frequentemente nei bambini, data la frequente presenza di vegetazioni adenoidi.
- g) i batteri appaiono colorati in blu scuro, a cocco o a bastoncino, in varie aggregazioni (grappoli, catenelle..), talora intracellulari, nei macrofagi e/o neutrofilii.

Tab. n°8 - Scheda raccolta dati clinico-anamnestici.

COGNOME :	NOME :	ETÀ:
PROFESSIONE :	AMBIENTE : (cani, gatti, altro...) :	
MEDICO INVIANTE : (ORL, Allergologo, Pneumologo, Altro) :		
SINTOMATOLOGIA RIFERITA :		
PERENNE	STAGIONALE (se stagionale indicare il/i mesi) :	
PERIODICA		
IN ATTO	NON IN ATTO	
TERAPIA IN CORSO : no si : (indicare il/i farmaci, se topica o sistemica, da quanto tempo in atto)		
PRECEDENTI RINOCITOGRAMMI : no si (indicare il grado)		
EVENTUALE VALUTAZIONE RINOSCOPICA :		

APPLICAZIONI NELLA PRATICA CLINICA

Il concetto emergente dell'interpretazione della reazione allergica è costituito dalla identificazione della patologia rinitica in un processo flogistico cronico, che cioè tende a perdurare anche in assenza dei sintomi e che è strettamente correlato all'esposizione all'allergene causale.

Presupponendo i concetti di atopia, intesa come predisposizione genetica a produrre IgE specifiche, e di sensibilizzazione, che è il processo immunologico che conduce alla sintesi di IgE specifiche in maniera continuativa e persistente, gli aspetti che più direttamente interessano il clinico sono l'accessualità sintomatologica e soprattutto il processo di cronicizzazione.

Partendo dallo stadio di preallergia cioè quello in cui si trova un soggetto sensibilizzato, che presenta una sintesi di IgE (accertabile con le prove allergometriche cutanee), ma che non abbia mai sviluppato sintomi allergici in seguito all'esposizione all'allergene, vedremo come si sviluppano le altre fasi della reazione allergica.

A questo punto per giungere allo stadio di malattia, cioè di comparsa dei sintomi in conseguenza dell'esposizione all'allergene, occorre che intervengano dei fattori patogenetici aggiuntivi.

Tra questi fattori sicuramente gioca un ruolo preponderante l'esposizione ad alte concentrazioni di allergene: a questo proposito è stato ipotizzato che fino al 40% della popolazione potrebbe sviluppare una allergia agli acari se venisse esposta ad alti livelli ambientali di acari (superiori per esempio a 10 mcg/mc di Der p1).

Naturalmente anche altri fattori ambientali possono favorire lo sviluppo della reazione allergica, tra questi occorre ricordare in primo luogo il fumo di sigaretta, che determina indirettamente un'incrementata sinte-

si di IgE, in quanto i macrofagi, stimolati da una proteina presente nel fumo di tabacco, rilasciano IL-6, che è un fattore di attivazione plasmacellulare.

La polluzione atmosferica svolge pure un importante ruolo scatenante, poichè è stato dimostrato che vari inquinanti (per esempio l'ozono, il biossido d'azoto, l'anidride solforosa, etc), determinando un danno a livello delle mucose respiratorie, favoriscono la penetrazione allergenica. Questi agenti inquinanti svolgerebbero pure un altro importante ruolo patogenetico, in quanto è stato dimostrato che un'esposizione ad elevate quantità, riscontrabili per esempio in grossi centri urbani in determinate condizioni atmosferiche, induce l'espressione di molecole d'adesione (ICAM-1) a livello epiteliale. Questo fenomeno unito all'esposizione allergenica è pertanto responsabile dell'aggravamento dei sintomi respiratori nei soggetti allergici, in quanto determina un peggioramento della flogosi allergica e un incremento dell'iperreattività non-specifica.

Inoltre, i particolati derivanti dalla combustione dei motori diesel agiscono come veicolo atmosferico dei pollini, aumentando così le probabilità di esposizione allergenica.

Soprattutto il microambiente domestico svolge un importante ruolo causale, sia per la presenza di particolari allergeni (acari, derivati epidermici degli animali domestici e muffe), che per l'esistenza di inquinanti (derivati dalla combustione, solventi, fumo, etc). Occorre ricordare che la produzione delle IgE specifiche presenta alcune caratteristiche peculiari: la sintesi avviene in maniera persistente e continuativa, cioè le IgE vengono prodotte anche in assenza di esposizione all'allergene specifico. Naturalmente in seguito all'esposizione, essa viene incrementata.

La fase delle manifestazioni cliniche, ovvero dell'allergia vera e propria, è caratterizzata dalla comparsa della fenomenologia clinica, tipicamente pochi istanti dopo l'esposizione all'allergene. Questo aspetto ha da un lato contribuito a classificare la patologia aller-

gica come manifestazione di ipersensibilità immediata, dall'altro però ha ingenerato una confusione fisiopatologica, in quanto fino a pochi anni fa il substrato patogenetico era considerato essere sostenuto eminentemente dalla liberazione acuta e massiva di mediatori mastocitari. Infatti si considerava la reazione allergica come una reazione che si esauriva in un breve lasso di tempo, salvo una ripresa dei sintomi, conseguente ad una nuova esposizione allergenica. Le recenti scoperte fisiopatologiche hanno permesso di riconsiderare la reazione allergica come un processo in realtà molto più complesso.

Due sono probabilmente i concetti più importanti che devono sempre essere tenuti presenti: anzitutto la reazione allergica è sempre correlata ad una contestuale risposta flogistica (già evidenziabile durante la fase immediata) e secondariamente la fenomenologia infiammatoria tende a persistere nel tempo, anche a distanza di giorni dall'esposizione allergenica.

Quest'ultimo aspetto permette di comprendere il nesso esistente tra le manifestazioni cliniche immediate e la comparsa di fenomeni di iperreattività sia specifica che non-specifica.

L'iperreattività specifica è caratterizzata dal cosiddetto fenomeno di "priming", cioè il soggetto esposto ad una seconda dose di allergene, uguale alla prima, presenterà una sintomatologia clinica più intensa, che sarà sempre maggiore ad ogni successiva esposizione. Questo aspetto riserva delle implicazioni nell'approccio terapeutico, in quanto può apparire inadeguata una terapia sintomatica rispetto ad una continuativa, nel caso un soggetto sia ripetutamente esposto all'allergene.

L'iperreattività non-specifica è caratterizzata dalla ripresa dei sintomi in seguito all'esposizione a sostanze non specifiche quali gli irritanti (fumo, polveri, profumi, sostanze chimiche, vento etc), tale fenomeno è correlato con la flogosi allergica sottostante.

A questo punto se il paziente continua ad essere esposto all'allergene causale, si passerà all'ultima fase della reazione allergica: la cronicizzazione.

Questo stadio presenta delle ripercussioni di vario ordine, ma un punto va comunque rimarcato spesso le manifestazioni cliniche sono solo la punta dell'iceberg, che è in realtà costituito dall'insieme degli eventi fisiopatologici che accadono durante la reazione allergica. La massa di questi eventi è infatti sostenuta dalla componente infiammatoria e dalla conseguente iperreattività non specifica. L'esempio paradigmatico di questo assunto ci viene offerto dal modello dell'allergia agli acari. E' consuetudine raccogliere anamnesi di pazienti sensibili agli acari che riportano una storia di accessualità sintomatologiche non continue nel tempo, a volte correlate con variazioni climatiche, stagionali o anche d'ambiente, a dispetto della ubiquità e della pressochè costante presenza nell'arco dell'anno di tali allergeni. Questa variabilità clinica si contrappone una costanza fenomenologica di eventi flogistici e di iperreattività. Infatti è dimostrabile nei soggetti allergici agli acari, da tempo asintomatici e privi di trattamento farmacologico antiallergico, la presenza a livello nasale e oculare di una situazione di infiammazione mucosale, seppur di lieve entità. Questa situazione è stata definita, in analogia con quanto dimostrato a livello bronchiale, "flogosi minima persistente" ed è caratterizzata dalla presenza di un infiltrato eosinofilo e neutrofilo e dall'espressione a livello epiteliale di molecole d'adesione. Tra queste molecole particolare rilievo assume l'ICAM-1, che non solo è il ligando di un'altra molecola d'adesione, LFA-1, espressa sui leucociti e che quindi permette di comprendere attraverso quale meccanismo avvenga il reclutamento ed il conseguente infiltrato leucocitario a livello mucosale, ma l'ICAM-1 è anche il recettore più importante dei rinovirus. Tale aspetto permette di comprendere due fenomeni molto comuni nei soggetti allergici: la maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie virali ed il

nesso tra allergia, infezioni virali ed attacchi asmatici. Infatti, soprattutto in ambito pediatrico è consolidata da molto tempo la correlazione esistente tra infezioni respiratorie virali e la conseguente comparsa di esacerbazioni asmatiche. Peraltro, inizialmente si considerava come evento primario l'infezione virale ed ancora oggi non è ben noto l'esatto meccanismo patogenetico, con cui l'infezione virale favorisca l'esacerbazione asmatica.

Comunque numerose indagini epidemiologiche hanno dimostrato in maniera incontrovertibile il preponderante ruolo eziologico svolto proprio dai rinovirus, responsabili di oltre il 70% delle infezioni virali respiratorie scatenanti un attacco asmatico in età pediatrica. Sulla base delle recenti indagini che hanno dimostrato la presenza continuativa dell'espressione di ICAM-1 a livello dell'epitelio nasale nei soggetti allergici agli acari e perennemente esposti a tali allergeni, si può appunto ipotizzare il nesso esistente tra infiammazione allergica, maggior suscettibilità alle infezioni da rinovirus e conseguente comparsa di attacchi asmatici.

Infine un punto molto importante da sottolineare è offerto dalla notevole prevalenza di sinusite cronica in soggetti asmatici. Da oltre un secolo è nota questa associazione, ma a tuttoggi non è ben chiaro il nesso patogenetico tra le due entità. E' peraltro ben noto che fino a quando non si sia curata adeguatamente la patologia sinusitica, il trattamento dell'asma si rivela sovente non del tutto soddisfacente. Il punto più difficile è rappresentato dall'approccio diagnostico, che presuppone il ricorso alla fibroendoscopia nasale, la quale permette un'agevole dimostrazione della patologia sinusitica così come in età pediatrica di un'eventuale patologia adenoidea. In particolare una nostra recente indagine evidenzia come in ambito pediatrico la patologia rinosinusitica è dimostrabile endoscopicamente in oltre il 50% dei bambini asmatici. Da un punto di vista fisiopatologico la rinite allergica perenne, caratterizzata da una flogosi minima persistente, predispone come abbiamo visto alle infezioni da rinovirus.

L'infezione virale è in grado di determinare una riattivazione del processo sinusitico sia per fenomeni disventilatori sinusali (causati dall'edema che colpisce il complesso ostiomeatale) che infiammatori per contiguità. La sinusite tende ad amplificare la risposta broncospastica e partecipa alla sintomatologia tussigena. Spesso infatti una sinusite cronica può dare come unico sintomo la tosse, che è di norma interpretata in un soggetto asmatico come facente parte della sindrome asmatica. Questo aspetto se non adeguatamente interpretato tende a sottostimare il reale ruolo patogenetico della sinusite.

Implicazioni cliniche della flogosi minima persistente

Dai concetti che abbiamo esposto si può evincere che il concetto di flogosi minima persistente presuppone una serie di implicazioni cliniche di particolare importanza, sinteticamente schematizzate in:

1) un differente monitoraggio della patologia allergica: il monitoraggio delle allergopatie respiratorie dovrebbe basarsi sull'impiego di una serie di differenti strumenti diagnostici, che permettano soprattutto la valutazione nel tempo del processo flogistico correlato all'esposizione allergenica, misurando i vari indici in maniera obbiettiva, anche in assenza di sintomi clinici (Tab. 9).

Tab. 9 - Monitoraggio delle allergopatie respiratorie.

- | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">- Citologia nasale/congiuntivale mediante scraping- Lavaggio nasale- Espettorato indotto- Test di provocazione non specifico- Dosaggio di mediatori sierici- Determinazione quantitativa dei livelli di esposizione allergenica |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

2) una definizione del reale obiettivo del trattamento: non appare più sufficiente il solo controllo dei sintomi, in quanto un corretto trattamento deve basarsi sul contestuale controllo dei sintomi e della flogosi allergica.

3) un differente traguardo del trattamento: appare pertanto evidente che la nuova prospettiva in cui ci veniamo a trovare comporta una serie di obiettivi da raggiungere (Tab. 10).

4) un nuovo approccio terapeutico: basato eminentemente sulla prescrizione di farmaci dotati anche di attività antiallergica ed impiegati in maniera continuativa.

Tab. 10 - Nuovi obiettivi del trattamento.

- Miglior controllo dei sintomi clinici
- Miglior controllo dell'iperreattività
- Miglior controllo della reazione flogistica allergica
- Prevenzione delle infezioni delle vie aeree superiori
- Incremento contenuto dei costi diretti
- Risparmio rilevante dei costi indiretti
- Miglioramento della qualità della vita.

Nuove tendenze terapeutiche

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che diversi farmaci, comunemente impiegati per il trattamento delle malattie allergiche, sono anche dotati di attività antiallergica-antiinfiammatoria. Essi sono cioè in grado di ridurre le varie componenti della reazione allergica: ad esempio inibendo il rilascio di mediatori e di citochine e diminuendo l'infiltrato cellulare flogistico. Alcuni di questi far-

maci antiallergici sono capaci anche di modulare l'espressione di ICAM-1 a livello epiteliale. Tale dato non solo aggiunge un nuovo meccanismo d'azione a questa eterogenea categoria farmacologica, ma può suggerirne un nuovo utilizzo, impiegandoli anche come preventivi delle riesacerbazioni asmatiche, conseguenti allo sviluppo di infezioni respiratorie da rinovirus. Infatti se il soggetto allergico esprimerà una minor quantità di ICAM-1, avrà meno opportunità di contrarre un'infezione da rinovirus e pertanto di presentare riesacerbazioni asmatiche.

Naturalmente questo concetto prevede un impiego protratto nel tempo dei farmaci antiallergici, che non dovrebbero più essere considerati solo come dei farmaci sintomatici, da utilizzare solo alla comparsa dei sintomi allergici. Del resto, come abbiamo visto, il sintomo è solo la punta dell'iceberg della reazione allergica. La maggior parte degli eventi della reazione allergica, anzitutto la flogosi e l'iperreattività, sono persistenti (permanendo ovviamente l'esposizione all'allergene) e sono cronologicamente disgiunti dalla sintomatologia. Infine, è da tenere sempre presente che raramente il paziente presenta una sola patologia respiratoria, per cui occorre valutare attentamente l'esistenza delle varie entità nosografiche.

Il punto cruciale è la dimostrazione pratica della flogosi sottostante. Infatti solo la dimostrazione della presenza di una flogosi allergica, anche e soprattutto in assenza della tipica sintomatologia, può giustificare il ricorso ad una terapia farmacologica continuativa. Pertanto il ricorso ad una indagine semplice, non invasiva, poco costosa e di rapida interpretazione quale è la citologia nasale permetterà di indirizzare adeguatamente il clinico nell'operare per un certo tipo di scelta terapeutica e potrà anche essere un valido strumento di persuasione nei confronti del paziente, o dei genitori se di età pediatrica.

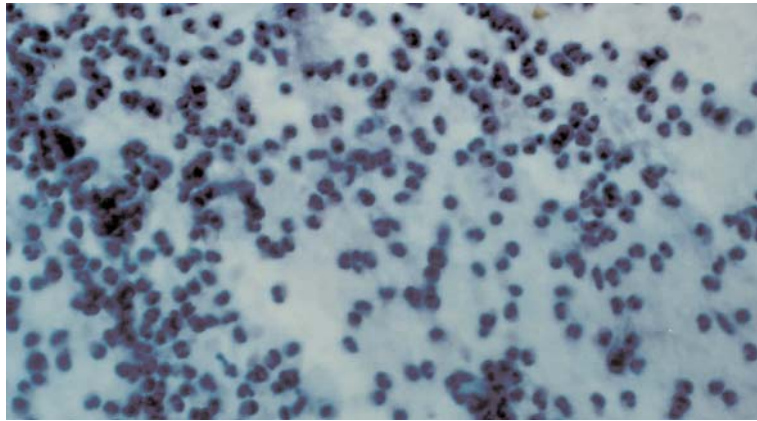


Fig. 7

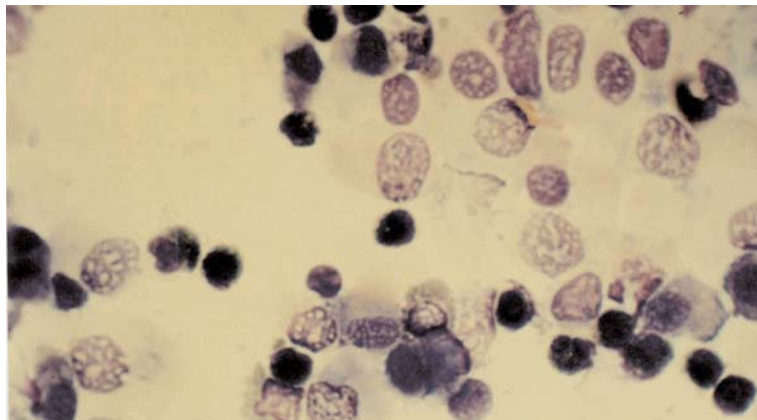


Fig. 8

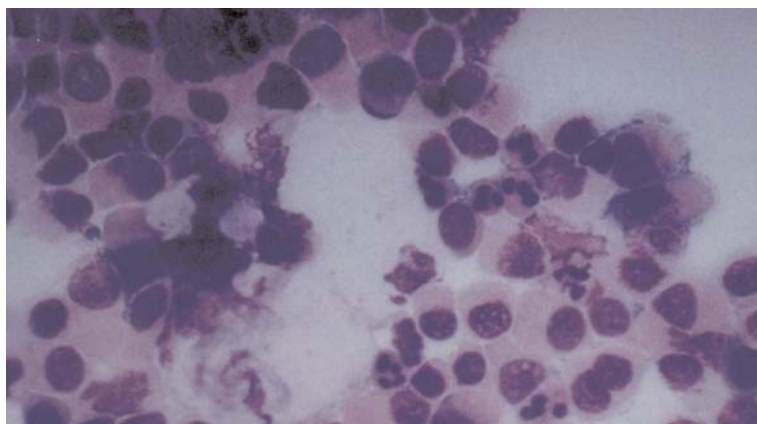


Fig. 9

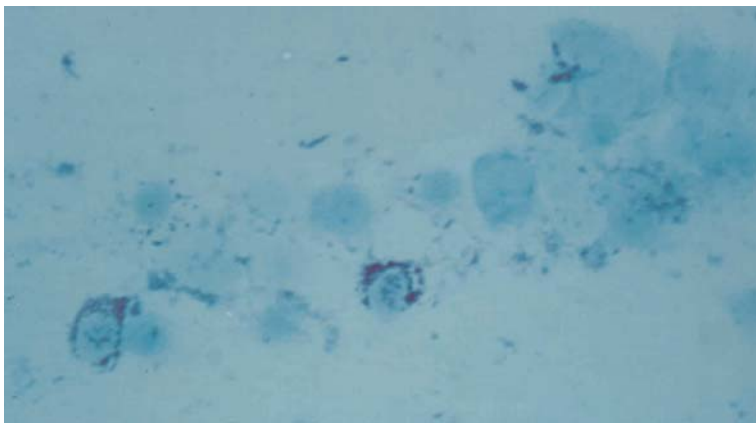


Fig. 10

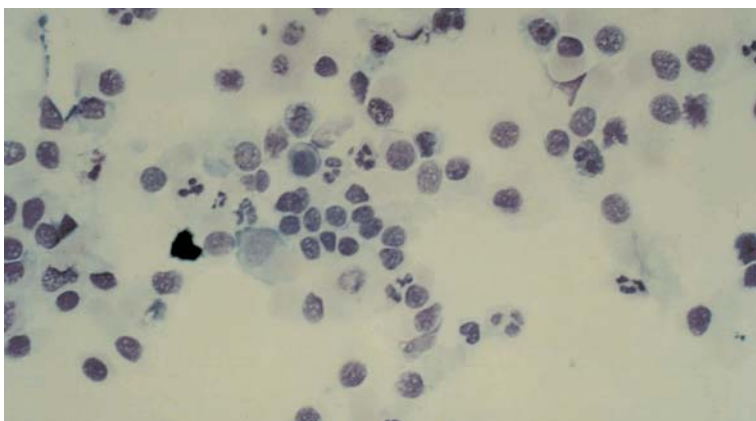


Fig. 11

CITOLOGIA NASALE

Infiltrato infiammatorio con evidenza di leucociti neutrofili (fig. 7,9,11), eosinofili (fig. 7,8), e cellule metacromatiche (fig.10).

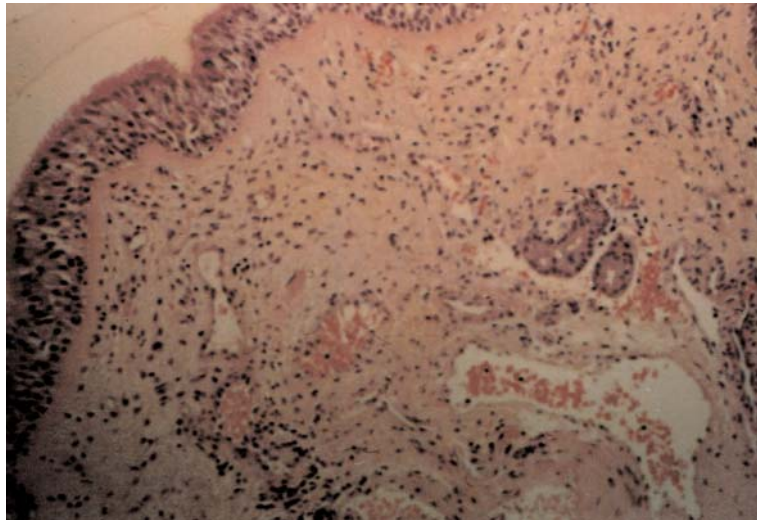


Fig. 12

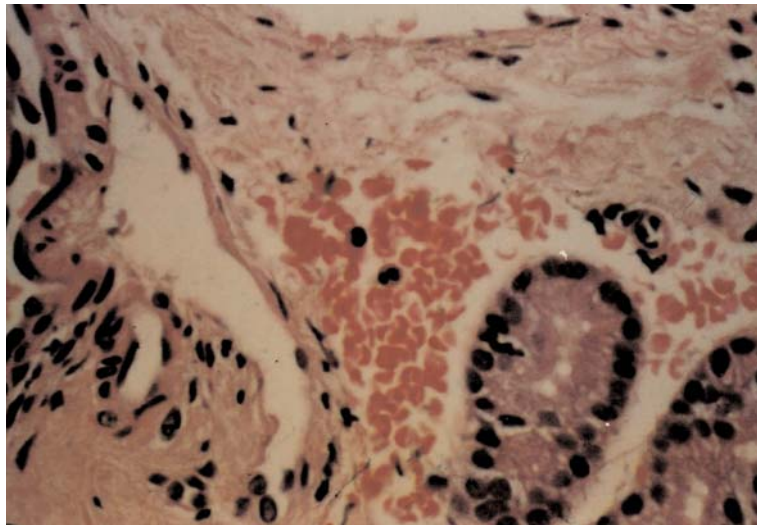


Fig. 13

Biopsia della mucosa nasale a minore e maggiore ingrandimento (fig. 12,13).

CONCLUSIONI

L'insieme delle evidenze sperimentali e cliniche, che abbiamo sinteticamente considerato permettono di trarre alcune conclusioni di fondamentale importanza clinica:

- 1) la reazione allergica deve essere considerata eminentemente come una risposta infiammatoria delle mucose respiratorie;
- 2) la flogosi allergica perdura finchè persiste l'esposizione all'allergene causale;
- 3) i sintomi non possono pertanto essere considerati un valido marker di reazione allergica;
- 4) la terapia farmacologica non deve essere più considerata solo in senso sintomatico, ma deve essere intesa in maniera continuativa sia per combattere la flogosi allergica e quindi ridurre l'iperreattività, che per poter prevenire alcune complicanze quali le infezioni virali;
- 5) la durata del trattamento andrà pertanto obbiettivata dalla documentazione del processo flogistico allergico mediante il ricorso all'indagine citologica.

La gestione del paziente con rinite allergica prevede pertanto, accanto alle comuni indagini diagnostiche, la citologia nasale, che occupa sicuramente una posizione di primo piano non solo finalizzata alla documentazione del sottostante processo infiammatorio ma anche al monitoraggio nel tempo. Infatti considerando proprio la rinite allergica come una patologia essenzialmente infiammatoria, l'acquisizione di dati obbiettivi sulla sua consistenza appare come l'approccio più razionale sia da un punto di vista diagnostico che prognostico e terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ciprandi G., Pronzato C., Ricca V., Bagnasco M., Canonica G.W.
Evidence of ICAM -1 expression on nasal epithelial cells in acute rhinoconjunctivitis due to natural pollen exposure.
Allergy, suppl., 16, 48, 1011, 1993.
- 2) Ciprandi G., Buscaglia S., Pesce G., Pronzato C., Ricca V., Parmiani S., Bagnasco M., Canonica G.W.
Evidence of minimal persistent inflammation at mucosal level in symptomfree rhinitic subjects with allergy due to mites.
Allergy, suppl., 16, 48, 1011, 1993.
- 3) Dallari S., Marotti F., Galetti G. Anatomia delle vie aeree superiori ed inferiori. Da: *Fisiologia e fisiopatologia del tratto respiratorio integrato*. pp 10-23. Edizioni scientifiche Valeas, 1995.
- 4) Meltzer E.O., Orgel H. A., Jalowayski A. Nasal cytology. Da: *Rhinitis mechanism and management*. Edited by: Naclerio R.M., Durham S.R., Mygind N. Vol. 123. Marcel Dekker, 1999.
- 5) Meltzer E.O., Orgel H. A., Rogenes P.R., Field E.A. Nasal cytology in patients with allergic rhinitis: effects of intranasal fluticasone propionate.
J Allergy Clin Immunol , 94, 4, 708-715, 1994.
- 6) Ciprandi G., Ricca V., Canonica G.W.,
Significato biologico delle IgE nelle allergopatie.
Biochim.Clin.Suppl. 1/9,45, 1993.
- 7) Ricca V., Fiorucci G.C., Ciprandi G., Canonica G.W.
Il contributo del laboratorio nella diagnostica allergologica.
Biochim. Clin Suppl. 1/9, 45, 1993.
- 8) Ciprandi G., Pronzato C., Ricca V., Passalacqua G., Bagnasco M., Canonica G.W.
Allergen specific challenge induces intercellular adhesion molecule -1 (ICAM -1 or CD 54) on nasal epithelial cells in allergic subjects : relationship with early and late inflammatory phenomena.
Am. J Respir Crit Care Med 1994; 150 : 1653 -9.
- 9) Ciprandi G., Tosca M., Ricca V., Passalacqua G., Fregonese L., Fasce L., Canonica G.W.
Cetirizine treatment of allergic cough in children with pollen allergy
Allergy 52, 1997
- 10) Ciprandi G., Passalacqua G., Mincarini M., Ricca V., Canonica G.W.
Continuous versus on demand treatment with cetirizine for allergic rhinitis
Annals of Allergy , Asthma , 79,6, 507 - 511, 12, 1997 .
- 11) Ricca V., Ferrero P., Bairo A., Robba S., Marchello A.
La citologia nasale nel monitoraggio terapeutico della rinite allergica
Giorn It Allergol Immunol Clin (8/1) , 279 - 280, 1998
- 12) Ricca V., Pronzato C., Tosca M., Bairo A., Ciprandi G.

Il rinocitogramma standardizzato in pediatria : modalità esecutive e possibili applicazioni cliniche.
VI Congresso Nazionale Immunologia ed Allergologia Pediatrica. Atti, p. 88, 1994.

13) Ricca V., Ciprandi G., Tosca M., Landi M., Riccio A.M., Bagnasco M., Canonica G.W.
Cetirizine modulates allergic inflammation.
Highlights in Allergy , Clinical Immunology and Respiratory Diseases, Genova, Atti, p.74, 1997

14) Ricca V., Gani F., Amasio E., Codegone M.L., Pozzi E.
Nasal allergic inflammation: biopsy and cytology. Two points of view into the nose : comparative data.
Highlights in Allergy , Clinical Immunology and Respiratory Diseases, Genova, Atti, p.83, 1997

15) Tosca M., Bongiovanni A., Ricca V., Mela S., Ciprandi G.
Polisensibilizzazione nei bambini allergici.
Aria , ambiente & salute ,I, 3,15-16, 1998

16) International consensus report on the diagnosis and management of rhinitis. Allergy 19,49, 1994.

17) The impact of allergic rhinitis on quality of life and other airway diseases. Allergy 41,53, 1998.

18) Allergic and non allergic rhinitis. N. Mygind, R.M. Naclerio Editors Munksgaard 1993.

19) G. Ciprandi, G. Passalacqua. Note allergologiche. Genova 1998

20) M. Tosca, G. Ciprandi. Storia naturale della reazione allergica. UCB Pharma 1997

21) Meltzer E.O., Jalowayski A.A. Nasal cytology in clinical practice. Am. J. Rhinol, 1988; 2, 47-54.

22) Mygind N., Naclerio R.M. Allergic and non allergic Rhinitis. Ch. 8 Cytology di Meltzer E.O., Orgel H.A., Jalowayski A.A., pp 66-81, Munksgaard, 1993.