

지질함유 대식세포 지표(lipid-laden macrophage index)를 이용한 세기관지염 환아에서 흡인의 위험성 평가

인제대학교 의과대학 상계백병원 소아과 및 천식알러지센터, 진단검사의학과*

고지연 · 강 희 · 정주영 · 한태희* · 김창근

The evaluation of risk for aspiration using lipid-laden macrophage index in infants with bronchiolitis

Ji Yeon Koh, M.D., Hee Kang, M.D., Ju Young Chung, M.D.
Tae Hee Han, M.D.* and Chang Keun Kim, M.D.

Department of Pediatrics and Asthma Allergy Center, Department of Clinical Pathology*, Sanggye Paik Hospital, College of Medicine, Inje University, Seoul, Korea

Purpose : We investigated the risk of aspiration using the lipid-laden macrophage index(LLMI) from laryngeal lavages in infants with bronchiolitis.

Methods : Laryngeal lavages from 22 infants with acute bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus(RSV) were evaluated during the acute stage. Repeat studies were performed at 3 to 4 weeks after the initial study(remission stage). Lavage cell counts and differentials were determined. The amount of lipid per single macrophage was evaluated and the LLMI was determined by evaluating 100 cells. Comparisons between acute stage and remission stage were made. Twenty-four hour pH monitoring(pHm) was performed in 12 patients.

Results : The total cell number was significantly higher in the acute stage compared with the remission stage($P<0.05$). The LLMIs in the acute stage were significantly higher than those in the remission stage($P<0.05$). The neutrophils percentage of laryngeal lavage correlated with the LLMI($r=0.69$, $P<0.001$). Four children had positive pHm recordings(pH-positive infants) and eight had negative pHm recordings(pH-negative infants). The pH-positive infants had higher LLMI and higher neutrophils percentage than those of the pH-negative infants($P<0.05$).

Conclusion : These findings suggest that there is a transient increased risk of aspiration during bronchiolitis. The LLMI from laryngeal lavage may be a useful marker for pulmonary aspiration in infants with bronchiolitis. (Korean J Pediatr 2006;49:763-768)

Key Words : Bronchiolitis, Lipid-laden macrophage, Laryngeal lavage, Aspiration

서 론

세기관지염은 영아와 소아에서 입원의 흔한 원인이다. 이전에 건강했던 영아들이 respiratory syncytial virus(RSV)에 감염시 흡인(aspiration)의 위험이 증가될 수 있음이 최근 보고되고 있다¹⁾. 흡인은 그 질환의 중증도를 잘못 평가하고 잘못된 치료를 함으로써 과민성 기도 질환을 일으킬 수도 있다²⁻⁴⁾. 그러나 이런 흡인은 방사선학적 검사에서 항상 발견할 수 있는 것은 아니며,

아직 이를 진단⁵⁻⁷⁾하는 gold standard는 없는 실정이다.

흡인이나 위식도역류증(gastroesophageal reflux, GER)과 같이 세포과피를 동반하는 폐손상은 지질의 분비와 지질함유 대식세포(lipid-laden macrophages)의 형성을 일으킨다. 지질함유 대식세포 지표(lipid-laden macrophage index, LLMI)는 폐포대식세포내 지질함유량의 반정성적 지표로서 일반적으로 기관지폐포세척에 의해 얻어지며, 폐흡인의 지표로 널리 사용되어왔다¹⁰⁻¹²⁾. 후두경을 이용한 후두흡침법(laryngeal swab technique)은 세균성 감염 진단을 위해 기도에서 검체를 얻는 최소한의 침습적인 술기이다^{13, 14)}. 그러나 세기관지염 등의 소아 기도 질환에서 폐흡인 유무를 진단하는데 있어 후두세척술을 사용한 적은 아직 없다.

본 연구는 후두세척술을 이용하여 얻어진 LLMI로 급성세기

접수 : 2006년 2월 20일, 승인 : 2006년 4월 4일
책임저자 : 김창근, 인제대학교 상계백병원 소아과 및 천식알러지센터
Correspondence : Chang Keun Kim, M.D.
Tel : 02)950-1663 Fax : 02)950-1662
E-mail : kimck@sanggyepaik.ac.kr

관지염의 흡인의 위험성을 평가하고자 한다. 또한 저자들은 LLMI와 기도염증세포 사이의 연관성에 대해서도 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구는 1998년 11월부터 2000년 10월 사이에 후두세척술 (flexible laryngoscopy with laryngeal lavage)을 받은 신경학적 이상이 없는 이전에는 건강했던 영아 22명을 대상으로 하였다. 대상군은 남아 12명, 여아 10명 (median 5.0개월; range 3.0-18.0개월)으로 구성되었다. 모든 환아는 비인두 흡인물(nasopharyngeal aspirates, NPA)에서 간접면역형광법을 이용하여 6개의 호흡기 바이러스(RSV, adenovirus, influenza viruses A and B, and parainfluenza 1 and 3)에 대한 선별검사를 하였고, 후두세척액에서 세균배양검사를 시행하였다. 원래 27명이 본 연구에 포함되었으나 추적검사가 되지 않은 5명은 대상에서 제외되었다. 모든 대상군에게 과거력 문진, 신체검사, 기본 혈액검사를 시행하였다. 식도 pH 측정(Esophageal pH monitoring)은 시술이 가능한 12명의 환아들에서 시행하였고, 그 결과에 따라 위식도역류증이 의심되는 환아군(pH 양성군)과 위식도역류증의 진단기준에 부합하지 않는 환아군(pH 음성군)으로 각각 분류하였다.

대상군은 처음으로 RSV 세기관지염을 앓아 입원한 환아들이었고, 세기관지염의 진단기준은 빈호흡, 호흡곤란, 천명 증상과 청진상 미세한 염발음이 들리는 경우로 진단하였다¹⁵⁾. 미숙아, 파만성기도질환, 연하곤란, 위식도역류증, 다른 심폐질환의 과거력이 있는 경우와 아토피성 피부염, 아토피 가족력이 있는 영아는 대상에서 제외시켰다. RSV 감염은 비인두 흡인물(nasopharyngeal aspirates, NPA)에서 바이러스 항원을 검출하거나 또는 세포배양에서 바이러스를 확인함으로써 확진되었다¹⁶⁾. 대상환아들은 입원 기간 중 스테로이드를 포함하지 않은 고식적 치료를 받았고, 산소투여 없는 상태에서 10시간 이상 호흡기 증상이 없으면서 산소포화도>93%를 만족하는 경우에 퇴원하였다¹⁷⁾. 급성기에 검사를 시행하였고, 처음 검사한 지 3-4주 후인 회복기에 추적검사를 시행하였다. 본 연구는 모든 대상의 부모로부터 동의하에 이루어졌다.

2. 후두세척술

후두세척술은 3.6-mm 소아용 내시경(Olympus BF3C30; Olympus, New Hyde Park, NY)을 사용하여 입원 3-4일 사이 (급성기)에 시행하였다. 진정치는 면봉에 묻힌 2% lidocaine과 경구용 chloral hydrate(Pocral syrup 10%-100 mg/mL)를 사용하였다. 대상군 모두 상기도에 albuterol과 lidocaine 흡입처치를 시행하여 국소마취를 유도하였다. 시술 전기간 동안 산소 준비, 정맥의 유지(IV access), 그리고 심전도와 pulse oxymeter

를 통한 감시를 유지하였다. 시술은 후두경으로 상기도를 관찰한 후, 후두경의 끝을 glossoepiglottic fold(supraglottic larynx)에 고정하고 실온의 멸균된 생리식염수 2 mL(<10 kg) 내지 3 mL (>10 kg)로 세척 후 100-150 mmHg로 흡인하여 즉시 무균용기 내로 회수하였다. 수 차례 시행된 후두세척액은 한 개의 용기에 합친 후 즉시 얼음백에 넣었다. 추적검사는 처음 검사한 날로부터 3-4주 후(회복기)에 시행되었다.

3. 후두세척액의 처리와 분석

합쳐진 후두세척액은 두 개의 용기에 나누었다. 한 개의 용기는 세균배양검사를 위해 병원 미생물부로 보내졌고, 또 다른 한 개의 용기는 나머지 후두세척액을 담아 세포검사를 위해 실험실로 보내졌다. 실험실로 보내진 후두세척액은 400 g, 4°C로 10분간 원심분리하여 세포와 상청액으로 분리하였다. 총세포수(total cell count)는 hemocytometer(Weber, Teddington, UK)를 이용하였고 세포분획(differentials)은 cytospin(Shandon, Pittsburgh, PA)으로 표본 도말 후 May-Grunwald Giemsa 염색하여 광학현미경 400배율하에서 400개 세포의 백분율을 계산함으로써 얻어졌다.

4. 지질함유 대식세포 지표

Cytospin으로 표본 도말된 세척액은 formaldehyde로 고정하고 말린 후 다시 Oil Red O로 염색하고 hematoxylin으로 대비 염색하였다. 개개의 폐포대식세포 세포질의 지질함유량은 0에서 4등급으로 나누었다. 한 개의 대식세포당 지질함유량은 Colombo와 Hallberg⁷⁾에 의해 기술된 반정성적 방법에 의해 0부터 4까지의 점수로 측정하였다(0, not opacified; 4, totally opacified)(Fig. 1). LLMI는 100개의 세포를 검사하여 400점까지 측정하였다.

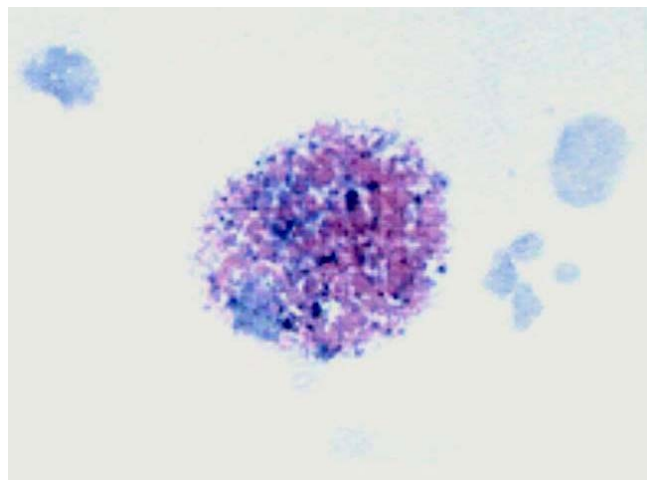


Fig. 1. A grade 3 Oil Red O stained alveolar macrophage. The 1/4-1/2 cytoplasm of a macrophage is opacified by the lipid droplets.

5. 식도 pH 측정

pH 측정은 single-channel probe로 측정되었다. 식도내 위치는 Strobel's mathematical mode(0.25×height in cm+5)에 근거하였고, Probe의 위치에 영향을 줄 수 있는 해부학적 변형이 있는 경우에는 흉부 X-선으로 올바른 위치를 결정하였다¹⁸⁾. 검사는 24시간 동안 시행하였다. pH 양성(pH-positive)은 pH 측정기간의 8% 이상기간에서 pH<4를 보인 경우로 정의하였다¹⁹⁾. 24시간 식도 pH 측정은 총 22명 영아 중 12명에서 측정되었다. 5명은 probe 주입에 어려움이 있었고, 5명은 동의를 얻지 못하였다.

6. 통계처리

자료의 분석은 GraphPad Prism Project(version 4) 프로그램을 사용하였다. 세포분석은 총 세포수의 백분율을 median[25-75th]으로 표시하였다. 본 연구에서는 표본수가 적어 비모수적 방법에 의한 통계적 추론을 하였다. 세기관지염의 급성기와 회복기 사이의 비교, pH 양성군과 pH 음성군 사이의 비교분석은 Mann-Whitney U test를 이용하였고, 후두세척액의 중성구 백분율과 LLMI 사이의 상관관계 분석은 Spearman's rank correlation test를 이용하였다. P값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 임상 특징

대상 환아들의 특징은 Table 1과 같다. RSV 세기관지염의 급성기와 회복기의 비교에서 급성기 때 혈청 호중구 수치가 의미있게 높았으며(P<0.001), 혈청 IgE와 호산구수는 의미있는 차이를 보이지 않았다.

pH 양성군과 pH 음성군의 비교에서는 세기관지염을 앓는 시기의 연령, 성별, 발열, 천명의 발생, 방사선학적 소견 및 백혈구 수치에 있어서 두 군간의 차이는 없었다(자료제시 안함). 그러나 입원 기간[pH 양성군: 11.5(10.0-14.0)일 vs pH 음성군: 8.0(5.0-12.0)일; P<0.05]과 기침 기간[pH 양성군: 26.0(18.0-27.0)일 vs pH 음성군: 16.5(14.0-24.0)일; P<0.05]이 pH 양성군에서

Table 1. Baseline Characteristics of the Subjects

	Acute stage (n=22)	Remission stage (n=22)
Age(mo)*	5.0(2.0-18.0)	5.0(2.0-18.0)
Sex(M:F)	12:10	12:10
Serum IgE(IU/mL)*	23(5-103)	32(7-200)
Blood eosinophils(/mm ³)*	235(30-670)	255(30-590)
Blood neutrophils(10 ³ /mm ³)*	3.3(2.5-6.1) [†]	2.4(1.5-5.3)

*Data are expressed as median(range)
[†]P<0.001 compared with remission stage

같이 두 군간에 의미있는 차이를 보였다(Table 2).

2. 시술 합병증

환아들은 후두내시경 시술 중 일시적 저산소증(n=1), 경증비출혈(n=1) 등 총 2건의 시술관련 합병증이 있었으나 시술을 마치는 데는 지장이 없었다. 또한 시술 후 3명에서 일시적인 씹기침이 있었으나 자연히 소실되었다. 기관지폐포세척술시 있을 수 있는 기관지수축이나 서맥의 부작용은 본 후두세척술에서는 나타나지 않았다.

3. 기본 후두세척액 자료 비교

후두세척액의 총 세포수와 각 세포의 세포분획은 Table 3과 같다. 총 세포수는 급성기 때 회복기보다 의미있게 높았다(P<0.01). 세포분획의 비교에서는 대식세포, 중성구에서 두 군간 차이가 있었다. 중성구 백분율은 급성기에서 회복기에 비해 의미있게 높았으며(P<0.001), 대식세포 백분율은 급성기에서 회복기에 비해 의미있게 낮았다(P<0.01). 림프구와 호산구의 백분율은 두 군간 의미있는 차이가 없었다.

4. LLMI 자료비교

급성기와 회복기의 LLMI는 Fig. 2와 같다. 급성기의 LLMI는 35.0[12-60](median[25-75th])로 회복기의 16.5[9.5-23.5]에 비해 의미있게 높았다(P<0.05).

5. 식도 pH 측정에 따른 세포분석

pH 양성군과 pH 음성군에서 각각 급성기와 회복기의 LLMI 변화는 Fig. 3과 같다. pH 양성군의 급성기 LLMI는 114.0[90.5-144.5](median[25-75th])로 회복기의 29.5[17.0-42.5]보다

Table 2. Comparison of Clinical Characteristics between pH-positive and pH-negative Groups

	pHm positive	pHm negative
Hospital stay(days)	11.5(10.0-14.0)*	8.0(5.0-12.0)
Cough(days)	26.0(18.0-27.0)*	16.5(14.0-24.0)

Data are expressed as median(range)
^{*}P<0.05 compared with pHm negative

Table 3. Laryngeal Lavage Cell Profiles*

	Acute stage (n=22)	Remission stage (n=22)
Total cells, 10 ⁴ /mL	93.5[39.0-168.0] [†]	37.3[16.3-73.0]
Macrophages, %	66.0[55.0-85.0] [†]	91.0[84.0-94.5]
Lymphocytes, %	2.5[1.0-4.0]	3.0[1.0-5.0]
Neutrophils, %	30.0[10.0-40.0] [‡]	6.5[2.0-14.5]
Eosinophils, %	0.0[0.0-0.0]	0.0[0.0-0.0]

*Data are expressed as median and interquartile range [25-75th]

[†]P<0.01 compared with remission stage

[‡]P<0.001 compared with remission stage

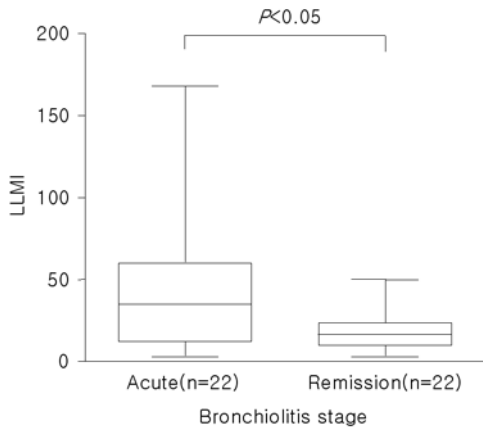


Fig. 2. LLMI at acute stage and at remission stage. the LLMI were significantly higher in the acute stage than those in the remission stage.

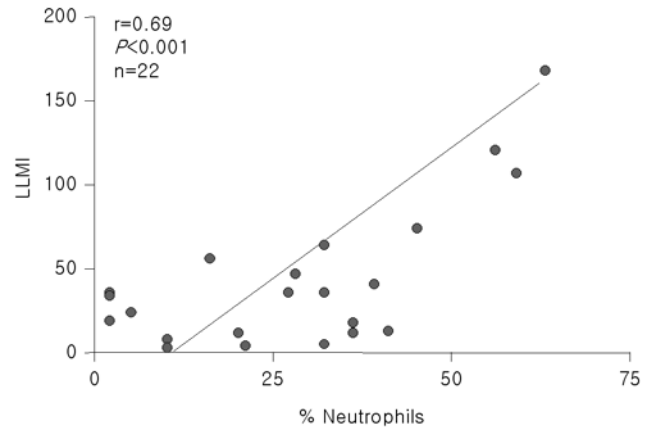


Fig. 4. Evaluation of the infants with bronchiolitis demonstrate a good correlation between laryngeal lavage neutrophils and the LLMI.

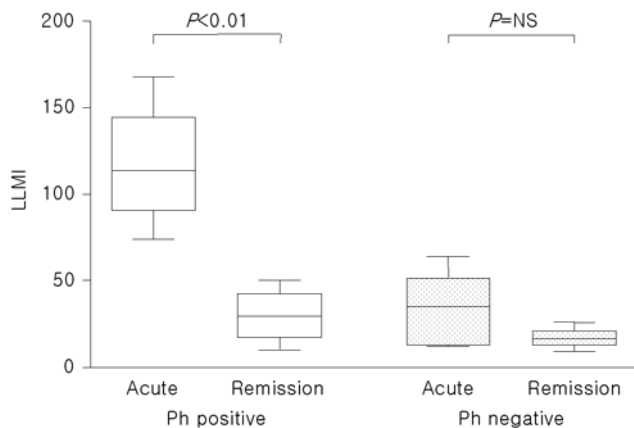


Fig. 3. LLMI in pH-positive and pH-negative infants. In pH-positive patients, LLMI in the acute stage were higher than in the remission stage. In pH-negative patients, no significant differences in the LLMI were observed in the acute and remission stage.

의미있게 높았다($P < 0.01$). 또한 pH 음성군의 급성기 LLMI는 35.0[12.5-51.5]로 회복기의 16.5[12.5-21.0]와 유의한 차이는 없었다($P = NS$).

6. 후두세척액의 중성구 백분율과 LLMI의 상관관계

후두세척액의 중성구 백분율과 LLMI 사이의 상관관계는 Fig. 4와 같다. 중성구 백분율과 LLMI는 전체 대상군에서 유의한 상관관계를 나타내었다($r = 0.69, P < 0.001$).

고 찰

본 연구는 급성세기관지염 환자의 후두세척액으로 얻어진 LLMI를 이용하여 흡인의 위험성을 분석한 최초의 연구이다. 세기관지염의 급성기에는 회복기에 비해 총세포수와 LLMI가 의미있게 증가되었다. 본 연구에서 대상군은 식도 pH 측정의 결과에

따라 pH 양성군과 pH 음성군으로 나누었다. pH 양성군에서는 후두세척액의 중성구 백분율과 LLMI가 pH 음성군에 비해 높았고 이 둘 사이에는 의미있는 상관관계가 있었다. 이상의 결과들은 급성세기관지염 때 흡인의 위험성이 증가한다는 것을 의미하며 LLMI가 세기관지염 환자에서 흡인의 유용한 지표가 될 수 있음을 의미한다.

저자들은 지질함유 대식세포를 얻기 위해 후두세척술을 사용하였다. 흡인을 진단하는 데 가장 흔히 사용되는 방법은 바륨관장, 흉부 X-선²⁰, 식도 pH 측정이다. 그러나 이 중 흡인의 진단에 있어 민감도와 특이도를 충분히 만족하는 검사는 없다. 흡인의 진단을 위한 gold standard는 여전히 알려지지 않은 상태이다. 이전 연구에서 기관지폐포세척술로 폐포의 지질량을 측정하고 분석하여 LLMI를 소개한 경우¹²)가 있었고, 후에 LLMI의 특이도를 높이기 위하여 개선된 반정성적 지표(modified, semi-quantitative index)를 사용한 연구⁷)도 있었다. 이 방법은 현재 흡인이나 역류를 진단하는 데 사용되고 있다. 기관지폐포세척술은 지질함유 대식세포를 얻는 데 있어 침습적인 방법인 데 반해, 본 연구에서 사용된 후두세척술은 기관지폐포세척술에 비해 침습적이지 않아 임상에 적용시켜 바륨관장과 식도 pH 측정을 대체할 수도 있을 것으로 생각된다.

LLMI는 민감도와 특이도 때문에 흡인의 진단적 도구로 사용하는 것에 대해 많은 이의가 제기되어 왔다^{21, 22}). 게다가 흡인된 음식이 연하관란 때문에 직접 폐로 들어가는 것인지 아니면 위식도역류증 때문에 이차적으로 흡인이 일어나는 것인지 구별하는 것은 힘들다²³). 한 연구에서는 LLMI가 50-69%의 민감도와 86-88%의 특이도를 가진다고 보고하였다^{21, 24}). 그러나 민감도에 대한 다른 의견도 존재한다. LLMI를 기술한 첫 연구¹²)에서 100 이상의 LLMI는 100%의 민감도와 57%의 특이도를 보였다. 또한, 100 이상의 LLMI에 대한 94% 민감도와 98%의 음성 예측치를 보고한 연구결과²²)가 있었고, 반정성화된 LLMI의 측정이 다른 방사선학적 검사들보다 민감도가 높다는 연구결과⁷)도 보고

된 바 있다. 또 유도객담 내에서 lipid index를 측정하여 90%의 민감도와 89%의 특이도를 보였던 연구결과²⁵⁾도 있었다. 이와 같이 여러 연구결과들에서 LLMI는 단독으로 진단적 의미를 가질 만큼 특이도가 높지는 않으나 다른 진단적 검사들보다 민감도가 높은 것으로 보여 소아의 기도질환에서 흡인의 가능성을 진단하는 많은 검사들 중에서 유용한 검사가 될 것으로 여겨진다.

최근의 한 연구²⁶⁾는 쥐 모델에서 흡인에 대한 새로운 진단법을 제시하였다. 이 연구의 저자들은 폐포대식세포내의 유단백인 α -lactalbumin을 면역세포화학법(immunocytochemical method)으로 염색하여 Oil red O staining으로 흡인을 진단하는 것보다 민감도와 특이도가 높음을 보고하였다. 그러나 현재로는 면역세포화학(immunocytochemistry)이 아직 임상에서 이용이 가능하지 않아 이에 대한 임상적 응용이 확립되어야 하는 상태이다. 따라서 이 진단법에 대한 임상적 응용이 확립될 때까지는 현재 사용되고 있는 LLMI 측정이 흡인을 진단하는 데 가장 유용한 검사가 될 것으로 생각된다.

본 연구에서 흡인은 RSV 세기관지염에서 일시적인 현상이었다. 결과에서 나타난 바와 같이 급성기 LLMI는 회복기의 LLMI보다 의미있게 높았다. 이러한 소견은 세기관지염 급성기 때 흡인의 위험성이 증가한다는 것을 보여준다. 이는 호흡기 증상이 있는 pH 양성군 중 의미있게 많은 수가 기관지폐포세척액에서 기도염증과 흡인을 의미하는 이상소견을 보였던 Sacco 등²⁷⁾의 연구와 일치한다. 또한, 저자들은 급성기와 회복기 때 LLMI의 명확한 차이를 기술하였고, 이는 RSV 세기관지염의 급성기 때 일시적 연하장애가 있고 2-4주경 저절로 교정된다고 보고한 Khoshoo 등¹⁾의 연구와 같은 결과를 보였다.

후두세척액의 중성구 백분율은 LLMI와 상관관계가 있었고, pH 양성군은 pH 음성군에 비해 더 높은 LLMI와 중성구 백분율을 보였다. 이러한 소견은 후두세척액으로부터 얻은 LLMI가 세기관지염 환아에서 폐흡인과 중성구염증의 유용한 지표임을 보여준다. Hernandez 등²⁸⁾은 세기관지염의 빠른 악화를 보인 환아에서 기관지경을 이용하지 않은 기관지세척술을 시행하였고, 총 6명 중 5명이 LLMI 100 이상을 보였다. 본 연구에서 LLMI가 더 낮은 데에는 몇 가지 이유가 있다. 첫째로 본 연구의 검체는 하부기도가 아니라 후두에서 얻어졌고, 둘째로 Hernandez의 연구와는 달리 본 연구의 대상군들은 중환자실이 아니라 일반 병동에 입원한 세기관지염 환아들이었다. 따라서 본 연구에서 LLMI의 정도가 더 낮은 것은 질병의 심각도가 더 낮기 때문인 것으로 생각된다.

호흡기 질환이 있는 환아들에서 기관지폐포세척술을 시행하는 것은 기술적 어려움과 윤리적 문제로 인해 많은 제약이 있을 수 있다²⁹⁾. 최근 대부분의 조사자들은 LLMI를 측정하기 위해 기관지내시경을 사용하지만 이것은 침습적인 방법이다. 아직까지 최소한의 침습적 방법인 후두경을 사용하여 LLMI를 측정하는 연구는 없었다. 본 연구에서는 기관지폐포세척술을 했을 때 간혹 있을 수 있는 심각한 부작용은 보이지 않았다²⁹⁾. 본 연구에서 후두

세척액의 세포생존율은 약 80%로(자료 제시 안함), 객담세포생존율보다는 높고 기관지폐포세척액의 세포생존율보다는 낮았다.

결론적으로 본 연구는 세기관지염 시기에 일시적인 흡인의 위험이 증가한다는 것을 보여준다. 후두세척액으로 측정된 LLMI는 세기관지염 환아에서 흡인의 유용한 지표가 될 수 있다. 후두세척액에서 얻어진 LLMI가 기도 질환이 있는 소아에서 식도 pH 측정을 대체할 수 있는지에 대해 더 많은 연구가 필요하다.

요 약

목적 : 후두세척술을 이용하여 얻어진 LLMI로 급성세기관지염의 흡인의 위험성을 평가하고, LLMI와 기도염증세포 사이의 연관성에 대해서 연구하고자 하였다.

방법 : RSV 세기관지염을 앓은 22명의 환아에서 급성기와 회복기에 각각 후두세척술을 시행하여 총세포수와 세포분획을 계산하였다. 한 개의 대식세포당 지질함유량은 0부터 4까지의 점수로 측정하였고, LLMI는 100개의 세포를 검사하여 400점까지 측정하였다.

결과 : 세기관지염의 급성기에는 회복기에 비해 총세포수와 LLMI가 의미있게 증가되었다($P < 0.05$). 후두세척액의 중성구 백분율은 LLMI와 상관관계가 있었다($r = 0.69$, $P < 0.001$). pH 양성군은 pH 음성군에 비해 후두세척액의 LLMI와 중성구 백분율이 의미있게 높았다($P < 0.05$).

결론 : 본 연구는 세기관지염 시기에 일시적인 흡인의 위험이 증가한다는 것을 보여준다. 후두세척액으로 측정된 LLMI는 세기관지염 환아에서 흡인의 유용한 지표가 될 수 있다.

References

- 1) Khoshoo V, Edell D. Previously healthy infants may have increased risk of aspiration during respiratory syncytial viral bronchiolitis. *Pediatrics* 1999;104:1389-90.
- 2) Colombo JL, Hallberg TK. Airway reactivity following repeated milk aspiration in rabbits. *Pediatr Pulmonol* 2000;29:113-9.
- 3) Jack CL, Calverley PM, Donnelly RJ, Tran J, Russell G, Hind CRK, et al. Simultaneous tracheal and oesophageal pH measurements in asthmatic patients with gastro-oesophageal reflux. *Thorax* 1995;50:201-4.
- 4) Kiljander TO, Salomaa ER, Hietanen EK, Ovaska J, Helenius H, Liippo K. Gastroesophageal reflux and bronchial responsiveness: correlation and the effect of fundoplication. *Respiration* 2002;69:434-9.
- 5) Nussbaum E, Maggi JC, Mathis R, Galant SP. Association of lipid-laden alveolar macrophages and gastroesophageal reflux in children. *J Pediatr* 1987;110:190-4.
- 6) Kurlandsky Le, Vaandrager V, Davy C, Stockinger FS. Lipoid pneumonia in association with gastroesophageal reflux. *Pediatr Pulmonol* 1992;13:184-8.
- 7) Colombo JL, Hallberg TK. Recurrent aspiration in children :

- lipid laden alveolar macrophage quantitation. *Pediatr Pulmonol* 1987;3:86-9.
- 8) Cohen AB, Cline MJ. In vitro studies of the foamy macrophage of postobstructive endogenous lipid pneumonia in man. *Am Rev Respir Dis* 1972;106:69-78.
 - 9) Desai R, Tetley TD, Curtis CG, Powell GM, Richards RJ. Studies on the fate of pulmonary surfactant in the lung. *Biochem J* 1978;176:455-62.
 - 10) Colombo JL. Pulmonary aspiration. In: Hilman BC, editor. *Pediatric Respiratory Disease: Diagnosis and Treatment*. Philadelphia: Saunders WB, 1993:429-36.
 - 11) McVeagh P, Howman-Giles R, Kemp A. Pulmonary aspiration studied by radionuclide milk scanning and barium swallow roentgenography. *Am J Dis Child* 1987;141:917-21.
 - 12) Corwin RW, Irwin RS. The lipid-laden alveolar macrophage as a marker of aspiration parenchymal lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:576-81.
 - 13) Bhandari B, Singh SV, Sharma VK. Bacteriological diagnosis of pulmonary tuberculosis. A comparative study of gastric wash, laryngeal swab and lung puncture. *Indian J Pediatr* 1971;38:349-53.
 - 14) Lloyd AV. Bacteriological diagnosis of tuberculosis in children: a comparative study of gastric lavage and laryngeal swab methods. *East Afr Med J* 1968;45:140-3.
 - 15) Everard ML. Acute bronchiolitis—a perennial problem [letter]. *Lancet* 1996;348:279-80.
 - 16) Kaul A, Scott R, Gallagher M, Scott M, Clement J, Ogra PL. Respiratory syncytial virus infection: rapid diagnosis in children by use of indirect immunofluorescence. *Am J Dis Child* 1978;132:1088-90.
 - 17) Cheney J, Barber S, Altamirano L, Medico Cirujano, Cheney M, Williams C, et al. A Clinical Pathway for Bronchiolitis is Effective in Reducing Readmission Rates. *J Pediatr* 2005;147:568-70.
 - 18) Herbst JJ, Book LS, Bry PF. Gastroesophageal reflux in the “near miss” sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 1978;92:73-5.
 - 19) Bibi H, Khvolis E, Shoseyov D, Ohaly M, Ben Dor D, London D. The prevalence of gastroesophageal reflux in children with tracheomalacia and laryngomalacia. *Chest* 2001; 119:409-13.
 - 20) Piepsz A, Georges B, Perlmutter N, Rodesch P, Cadranet S. Gastro-oesophageal scintiscanning in children. *Pediatr Radiol* 1981;11:71-4.
 - 21) Bauer ML, Lyrene RK. Chronic aspiration in children: evaluation of the lipid-laden macrophage index. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:94-100.
 - 22) Adams R, Ruffin R, Campbell D. The value of the lipid-laden macrophage index in the assessment of aspiration pneumonia. *Aust N Z J Med* 1997;27:550-3.
 - 23) Colombo JL, Hallberg TK. Pulmonary aspiration and lipid-laden macrophages: In search of Gold(standards). *Pediatr Pulmonol* 1999;28:79-82.
 - 24) Ahrens P, Noll C, Kitz R, Willigens P, Zielen S, Hofmann D. Lipid-laden alveolar macrophages: a useful marker of silent aspiration in children. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:83-8.
 - 25) Parameswaran K, Anvari M, Efthimiadis A, Kamada D, Hargreave FE, Allen CJ. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration. *Eur Respir J* 2000;16:1119-22.
 - 26) Elidemir O, Fan LL, Colasurdo N. A novel diagnostic method for pulmonary aspiration in a murine model: immunocytochemical staining of milk proteins in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:622-6.
 - 27) Sacco O, Fregonese B, Silvestri M, Sabatini F, Mattioli G, Rossi GA. Bronchoalveolar lavage and esophageal pH monitoring data in children with “difficult to treat” respiratory symptoms. *Pediatr Pulmonol* 2000;30:313-9.
 - 28) Hernandez E, Khoshoo V, Thoppil D, Edell D, Ross G. Aspiration: a factor in rapidly deteriorating bronchiolitis in previously healthy infants? *Pediatr Pulmonol* 2002;33:30-1.
 - 29) de Blic J, Marchac V, Scheinmann P. Complications of flexible bronchoscopy in children: prospective study of 1328 procedures. *Eur Respir J* 2002;20:1271-6.