



SOCIETÀ ITALIANA
PER LE MALATTIE
RESPIRATORIE INFANTILI
SIMRI

Pneumologia Pediatrica

Volume 6, n. 24

Rivista trimestrale
Spedizione in A.P. - 45%
art. 2 comma 20/b
legge 662/96 Pisa
Reg. Trib. P.I. n. 12
del 3 giugno 2002

Studio e monitoraggio dell'inflammatione delle vie aeree

Organo ufficiale
della Società Italiana per le
Malattie Respiratorie
Infantili (SIMRI)

*Official Journal
of the Italian Pediatric
Respiratory Society*

www.simri.it

La misura dell'ossido nitrico <

nella pratica clinica

Il condensato dell'aria espirata <

in pneumologia pediatrica

La metodica dell'espettorato indotto <

Ruolo dei biomarker nel sangue periferico <
nella valutazione dell'inflammatione e
del controllo dell'asma nel bambino

Il ruolo delle IgE nell'asma <

Ruolo del BAL e della biopsia bronchiale <
nella caratterizzazione dell'inflammatione delle
vie aeree inferiori nell'asma bronchiale infantile

INDICE

SUMMARY

| | |
|--|----|
| Editoriale | 4 |
| <i>View point</i> | |
| La misura dell'ossido nitrico nella pratica clinica | 5 |
| <i>Nitric oxide measurement in clinical practice</i> | |
| G. Bonetto, G. Gottardi, S. Donegà, S. Carraro, S. Zanconato, E. Baraldi | |
| Il condensato dell'aria espirata in pneumologia pediatrica | 12 |
| <i>Exhaled breath condensate in paediatric pulmonology</i> | |
| M. Corradi | |
| La metodica dell'espettorato indotto | 20 |
| <i>The method of induced sputum</i> | |
| E. Milanesi, R. Pigozzi, G. Piacentini | |
| Ruolo dei biomarker nel sangue periferico nella valutazione dell'infiammazione e del controllo dell'asma nel bambino | 28 |
| <i>Role of peripheral blood biomarkers related to airway inflammation and monitoring of childhood asthma</i> | |
| S. La Grutta | |
| Il ruolo delle IgE nell'asma | 41 |
| <i>The role of IgE in asthma</i> | |
| A. Fiocchi, L. Terracciano, A. Martelli, T. Sarratud | |
| Ruolo del BAL e della biopsia bronchiale nella caratterizzazione dell'infiammazione delle vie aeree inferiori nell'asma bronchiale infantile | 49 |
| <i>The role of BAL and bronchial biopsy in the characterization of lower airway inflammation in childhood asthma</i> | |
| C. Stenghele, D. Snijders, C. Panizzolo, A. Barbato | |
| Congressi | 56 |
| <i>Congresses</i> | |
| Sommario Volume 6 | 58 |
| <i>Volume n°6 Summary</i> | |
| Indice degli Autori | 60 |
| <i>Authors Index</i> | |
| Indice delle parole chiave | 62 |
| <i>Key words Index</i> | |
| Articoli del prossimo numero | 67 |
| <i>Forthcoming articles</i> | |

Pneumologia Pediatrica

**Organo ufficiale della Società
Italiana per le Malattie Respiratorie
Infantili (SIMRI)**

Volume 6, n. 24 - Dicembre 2006

Spedizione in A.P. - 45%
art. 2 comma 20/b
legge 662/96 - N. 1047 del 12/07/2002 - Pisa
Reg. Trib. PI n. 12 del 3 giugno 2002

Direttore scientifico

Baraldi Eugenio (Padova)

Codirettori scientifici

Rusconi Franca (Firenze)

Santamaria Francesca (Napoli)

Segreteria scientifica

Carraro Silvia (Padova)

Comitato editoriale

Barbato Angelo (Padova)

Bernardi Filippo (Bologna)

Cutrerà Renato (Roma)

de Benedictis Fernando Maria (Ancona)

Peroni Diego (Verona)

Rusconi Franca (Firenze)

Santamaria Francesca (Napoli)

Tripodi Salvatore (Roma)

Gruppo Allergologia

coord. Pajno Giovanni (Messina)

Gruppo Disturbi respiratori nel sonno

coord. Brunetti Luigia (Bari)

Gruppo Educazione

coord. Indinnimeo Luciana (Roma)

Gruppo Endoscopia bronchiale e delle Urgenze respiratorie

coord. Midulla Fabio (Roma)

Gruppo Fisiopatologia respiratoria

coord. Verini Marcello (Chieti)

Gruppo Riabilitazione respiratoria

coord. Tancredi Giancarlo (Roma)

Gruppo Il polmone suppurativo

coord. Mario Canciani (Udine)

Direttore responsabile

Baraldi Eugenio (Padova)

© Copyright 2006 by Primula Multimedia

Editore

Primula Multimedia S.r.L.

Via G. Ravizza, 22/b

56121 Pisa - Loc. Ospedaletto

Tel. 050 9656242; fax 050 3163810

e-mail: info@primulaedizioni.it

www.primulaedizioni.it

Redazione

Minuti Angela

Realizzazione Editoriale

Primula Multimedia S.r.L.

Stampa

Litografia VARO - San Giuliano Terme (PI)

Clenil per Aerosol

R03BA01 Beclometasone dipropionato 0,8 mg/2ml sospensione da nebulizzare

RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

1. NOME DELLA SPECIALITÀ MEDICINALE: CLENIL 0,8 mg/2 ml sospensione da nebulizzare

2. COMPOSIZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA: 100 ml di sospensione sterile contengono: Principio attivo: beclometasone dipropionato 0,040 g. Per gli eccipienti, vedere 6.1. Non contiene conservanti.

3. FORMA FARMACEUTICA: Sospensione da nebulizzare. Per aerosol.

4. INFORMAZIONI CLINICHE: **4.1. Indicazioni terapeutiche:** Controllo dell'evoluzione della malattia asmatica e delle condizioni di broncostenosi. Riniti allergiche e vasomotorie, affezioni infiammatorie ed allergiche delle cavità nasali e del tratto rino-faringeo. **4.2. Posologia e modo di somministrazione:** Adulti: un flaconcino monodose per seduta 1-2 volte al giorno. Bambini: metà contenuto di un flaconcino monodose per seduta 1-2 volte al giorno. Il flaconcino reca una graduazione corrispondente a metà dose. Agitare energicamente prima dell'uso.

Per l'utilizzo eseguire le seguenti operazioni:

- 1) Flettere il flaconcino monodose nelle due direzioni.
- 2) Staccare il flaconcino monodose dalla striscia prima sopra e poi al centro.
- 3) Agitare energicamente scuotendo e rovesciando il flaconcino per rendere omogenea la sospensione. Ripetere questa operazione, finché l'intero contenuto non sia completamente ridisperso e mescolato.
- 4) Aprire il flaconcino monodose ruotando l'aletta nel senso indicato dalla freccia.

5) Esercitando una moderata pressione sulle pareti del flaconcino monodose far uscire il medicamento nella quantità prescritta ed immerterlo nell'ampolla del nebulizzatore.

6) In caso di utilizzo di metà dose, il flaconcino può essere richiuso capovolgendo e premendo il tappo. Il flaconcino richiuso deve essere conservato a temperatura compresa fra 2°C e 8°C (in frigorifero) e la quantità rimasta deve essere utilizzata entro 12 ore dalla prima apertura.

4.3. Controindicazioni: Infezioni virali e tubercolari attive o quiescenti locali. Soggetti con ipersensibilità individuale ai componenti. Generalmente controindicato in gravidanza e allattamento (v. par. 4.6).

4.4. Speciali avvertenze e speciali precauzioni per l'uso: Le infezioni delle cavità nasali o dei seni paranasali devono essere trattate con terapia appropriata, ma non costituiscono controindicazioni specifiche all'uso del CLENIL. Benché CLENIL sia in grado di controllare nella maggior parte dei casi la rinite allergica stagionale, uno stimolo abnormemente elevato di allergeni può richiedere appropriata terapia supplementare. Il trasferimento di pazienti in trattamento continuativo con steroidi per via generale alla terapia con CLENIL richiede precauzioni se vi è motivo di supporre che la funzionalità surrenalica sia alterata. Comunque inizialmente CLENIL va somministrato continuando il trattamento sistemico; successivamente questo va progressivamente ridotto controllando il paziente ad intervalli regolari (in particolare vanno effettuati periodici esami della funzionalità cortico-surrenale) e modificando la posologia di CLENIL a seconda dei risultati ottenuti. Durante i periodi di stress o di grave attacco asmatico i pazienti, sottoposti a tale passaggio, dovranno avere un trattamento supplementare di steroidi sistemici. La terapia con CLENIL non ha finora dato luogo al riscontro di una riduzione dei livelli di cortisolo plasmatico. Tale riduzione è stata osservata solo in pazienti che ricevevano il doppio della dose massima consigliata di beclometasone dipropionato somministrato mediante aerosol pressurizzato. Tenere il medicinale fuori dalla portata e dalla vista dei bambini.

4.5. Interazioni medicamentose ed altre: Non note. **4.6. Uso in gravidanza ed allattamento:** Non somministrare nel primo trimestre di gravidanza. Nell'ulteriore periodo, durante l'allattamento e nella prima infanzia CLENIL deve essere somministrato soltanto in caso di effettiva necessità e sotto diretto controllo del medico.

4.7. Effetti sulla capacità di guidare e sull'uso di macchine: Nessuno. **4.8. Effetti indesiderati:** A seguito della somministrazione di beclometasone dipropionato per via aerosolica, in alcuni pazienti può comparire candidosi della bocca o della gola. Pazienti con dati anamnestici o di laboratorio indicanti una precedente infezione possono sviluppare più facilmente tale complicazione. L'incidenza della candidosi sembra essere in relazione con la dose somministrata. L'affezione risponde generalmente ad appropriata terapia antifungina topica senza interruzione del trattamento con beclometasone dipropionato. L'insorgenza di tali infezioni fungine può essere minimizzata sciacquandosi regolarmente la bocca dopo ogni applicazione. In pazienti con vie aeree molto sensibili

l'uso del prodotto potrebbe dar luogo a tosse e raucedine. **4.9. Sovradosaggio:** I pazienti vanno tenuti sotto stretto controllo nel corso di trattamenti prolungati affinché, nell'improbabile evenienza che un uso eccessivo del preparato induca alterazioni della funzionalità surrenalica, il trattamento possa essere interrotto ed il paziente tempestivamente protetto dagli effetti della soppressione surrenalica mediante opportuna terapia sistemica.

5. PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE: **5.1. Proprietà farmacodinamiche:** CLENIL contiene come principio attivo il beclometasone 17,21-dipropionato, cortisonico dotato di spiccata attività antiinfiammatoria ed antiallergica topica sulla mucosa nasale e bronchiale. Il beclometasone dipropionato (BDP) è un corticosteroide di sintesi, di uso esclusivamente topico, con potente attività antiinfiammatoria, ridotta attività mineralcorticoida ed assenza di effetti sistemici. Nel test di vasocostrizione cutanea secondo Mc Kenzie il BDP è 5000 volte più attivo dell'idrocortisone, 625 volte più attivo del betametasone alcool, 5 volte più attivo del fluocinolone acetone e 1,39 volte più attivo del betametasone valerato. Possiede intensa e prolungata attività antiinfiammatoria nei confronti dell'edema da olio di croton, da carragenina, da formalina, da bianco d'uovo e da destrano e della reazione granulomatosa da corpo estraneo, con efficacia superiore a quella di altri corticosteroidi. Per via aerosolica CLENIL è indicato nella terapia dell'asma bronchiale, delle riniti allergiche e vasomotorie e delle manifestazioni infiammatorie delle affezioni rino-faringee. CLENIL è privo alle dosi consigliate di attività cortisonica generale: esso pertanto non dà luogo agli effetti sistemici ed alle controindicazioni ben note della corticoterapia. **5.2. Proprietà farmacocinetiche:** Studi di cinetica con beclometasone dipropionato marcato hanno dimostrato che dopo inalazione di una dose elevata solo il 20-25% viene assorbito. Una parte della dose somministrata viene deglutita ed eliminata nelle feci. La frazione assorbita in circolo viene metabolizzata per via epatica a monopropionato e a beclometasone alcool e successivamente escreta in forma di metaboliti inattivi nella bile e nelle urine. **5.3. Dati preclinici di sicurezza:** Tossicità acuta: DL₅₀ (topo per os) >4000 mg/kg; DL₅₀ (ratto per os) >4000 mg/kg; DL₅₀ (topo per i.m.) 400 mg/kg; DL₅₀ (ratto per i.m.) 420 mg/kg. Tossicità cronica: ratto per nebulizzazione (180 giorni), cane per nebulizzazione (90 giorni). La somministrazione non ha provocato alcuna alterazione del peso corporeo, della crasi ematica e del trofismo della mucosa delle vie respiratorie. Le funzioni epatiche e renali si sono mantenute nella normalità. Tossicità genetica: la somministrazione per nebulizzazione a ratte e conigli gravide non ha provocato segni di tossicità né sulla madre, né sui feti, né aborti, né diminuzione del numero dei nati.

6. INFORMAZIONI FARMACEUTICHE: **6.1. Elenco degli eccipienti:** Sodio cloruro, Polisorbato 20, Sorbitan monolaurato, Acqua depurata.

6.2. Incompatibilità: Non note. **6.3. Durata di stabilità a confezionamento**

integro: 2 anni. Tale periodo è da intendersi per il prodotto in confezionamento integro, correttamente conservato. **6.4. Speciali precauzioni per la conservazione:** Conservare il prodotto in posizione verticale, come riportato sulla confezione. I flaconcini monodose fuori dalla busta di protezione si conservano fino a 3 mesi. In caso di utilizzo di metà dose, il flaconcino richiuso va conservato a temperatura compresa fra 2° C e 8° C (in frigorifero) ed utilizzato entro 12 ore.

6.5. Natura del contenitore, confezione e relativo prezzo: Confezione interna: flaconcini monodose in polietilene con graduazione di metà dose, richiudibili, in bustine termosaldate di PET/Al/PE. Confezione esterna: astuccio in cartoncino stampato. Astuccio di 20 flaconcini monodose da 2 ml - €.

6.6. Istruzioni per l'uso: V. par. 4.2

7. TITOLARE A.I.C.: CHIESI FARMACEUTICI S.p.A., Via Palermo,

26/A - Parma

8. NUMERO DI A.I.C.: 023103132

9. DATA DI AUTORIZZAZIONE: 09/03/2003

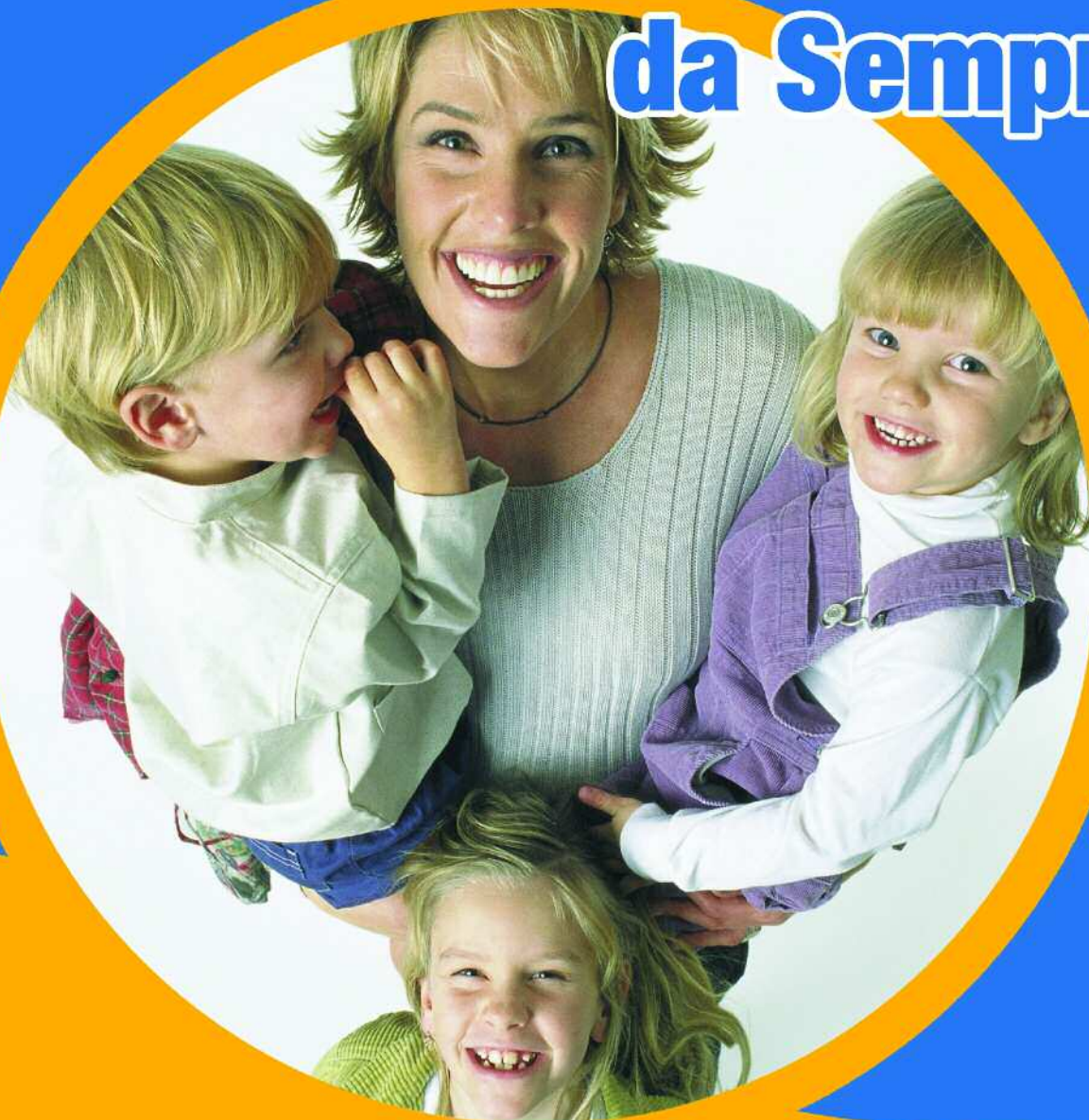
10. ULTIMA REVISIONE TESTO: Marzo 2003

TABELLA DI APPARTENENZA DPR 309/90: Non pertinente.

REGIME DI DISPENSAZIONE AL PUBBLICO: Specialità medicinale

da vendersi dietro presentazione di ricetta medica.

La Sicurezza da Sempre



Dep. al Min. Sal. in data 4/5/2004

Clenil per Aerosol

R03BA01 Beclometasone
dipropionato

0,8 mg/2ml sospensione da nebulizzare

Da oltre 20 anni Clenil per Aerosol è al passo con i tempi.

Oggi nella nuova formulazione sterile

 **Chiesi**

People and ideas for innovation in healthcare

Siamo pronti a monitorare l'infiammazione delle vie aeree?

È da tempo noto che l'asma è una malattia infiammatoria delle vie aeree. Alcuni studi pubblicati negli ultimi anni hanno dimostrato che a tale infiammazione contribuiscono, in misura differente da soggetto a soggetto, svariati meccanismi e cellule, suggerendo l'ipotesi che alla base dell'asma possano esserci diversi fenotipi infiammatori. Da queste considerazioni deriva la necessità di monitorare non solo i sintomi e la funzionalità respiratoria ma anche l'infiammazione delle vie aeree nei bambini asmatici. Per fare ciò si possono utilizzare diverse metodiche che vengono ampiamente discusse dagli autori che hanno contribuito a questo numero.

L'articolo di Stenghele et al., descrive la broncoscopia che, in associazione al broncolavaggio e alla possibilità di eseguire biopsie bronchiali, rappresenta la metodica di riferimento per lo studio diretto dell'infiammazione asmatica e del rimodellamento delle vie aeree. Gli altri articoli raccolti in questo numero descrivono invece metodiche per lo studio indiretto dell'infiammazione asmatica. Tutte queste tecniche hanno la caratteristica di essere non invasive, pur associandosi a un variabile grado di *discomfort* per il bambino.

L'articolo di La Grutta descrive in maniera esaustiva l'ampio panorama dei marker di flogosi dosabili nel sangue, entrando nel dettaglio del loro significato e delle loro variazioni in risposta alla terapia o a fattori ambientali. Accanto a questo articolo si colloca quello di Fiocchi et al. che ben illustra il significato del dosaggio nel sangue delle IgE specifiche in relazione alla malattia asmatica.

Milanesi et al. hanno contribuito con un articolo sull'espettorato indotto, ben descrivendo la tecnica di esecuzione e il significato di questa metodica che può essere molto informativa, anche se, purtroppo, talvolta di difficile esecuzione nei bambini.

Infine gli articoli di Bonetto e Corradi descrivono le due metodiche più recenti e meno invasive per lo studio dell'infiammazione asmatica: la misura dell'ossido nitrico (NO) esalato e l'analisi del condensato dell'aria espirata. La misura dell'NO espirato, marker indiretto di infiammazione eosinofila delle vie aeree, sta per entrare nella pratica clinica. L'analisi del condensato apre la strada allo studio della biochimica delle vie aeree ma, al momento, resta una metodica di ricerca.

Si tratta di un numero ricco di dati aggiornati e spunti interessanti.

Auguro a tutti una buona lettura!

Eugenio Baraldi

e-mail: baraldi@pediatria.unipd.it

Gea Bonetto, Genny Gottardi, Sara Donegà, Silvia Carraro, Stefania Zanconato, Eugenio Baraldi

Dipartimento di Pediatria, Università di Padova

La misura dell'ossido nitrico nella pratica clinica

Nitric oxide measurement in clinical practice

Parole chiave: asma, infiammazione delle vie aeree, ossido nitrico

Key words: *asthma, airway inflammation, nitric oxide*

Riassunto. L'ossido nitrico nell'aria espirata è un affidabile biomarker di infiammazione eosinofila delle vie aeree ed è misurabile con una tecnica non invasiva. Vi è quindi un interesse crescente in merito alla possibilità della sua applicazione nella pratica clinica ed il recente sviluppo di uno strumento portatile ha reso concreta tale prospettiva. La misura del FE_{NO} , come marker di flogosi eosinofila, può rappresentare anzitutto un aiuto nel modulare la terapia steroidea nei pazienti asmatici. Livelli elevati di FE_{NO} sembrano infatti predire la probabilità di risposta alla terapia con steroidi inalatori (ICS) e alcuni studi hanno inoltre dimostrato che l'introduzione del FE_{NO} nei percorsi decisionali dei pazienti asmatici può migliorare il rapporto costo-beneficio della terapia steroidea, o migliorando l'outcome stesso dei pazienti o riducendo il dosaggio complessivo di ICS a parità di outcome. Bassi valori di FE_{NO} durante la fase di riduzione della terapia steroidea sembrano avere un significato prognostico positivo ed il monitoraggio periodico del FE_{NO} alla sospensione degli ICS sembra predire le riacutizzazioni cliniche. Nel paziente con sintomatologia respiratoria aspecifica, la valutazione del FE_{NO} permette di individuare od escludere la presenza di flogosi eosinofila delle vie aeree, completando così le informazioni ottenute dai test di funzionalità respiratoria. In particolare i pazienti con fibrosi cistica o discinesia ciliare primitiva presentano valori bassi o normali di FE_{NO} . In conclusione, le evidenze disponibili supportano l'introduzione dell'utilizzo della misura del FE_{NO} anche nella pratica clinica, in particolare nella gestione del bambino con asma di difficile controllo e nella valutazione del paziente con sintomatologia respiratoria aspecifica.

Accettato per la pubblicazione il 21 novembre 2006.

Corrispondenza: Prof. Eugenio Baraldi, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Via Giustiniani 3, 35128 Padova; e-mail: baraldi@pediatria.unipd.it

Introduzione

L'ossido nitrico (NO) è un gas prodotto dalla trasformazione enzimatica dell'arginina in citrullina. L'enzima coinvolto nella reazione è l'ossidonitrico-sintetasi (NOS), presente nelle vie aeree in due isoforme costitutive ed un'isoforma inducibile, espressa in seguito a stimoli infiammatori. Essendo un radicale libero, l'NO è una molecola instabile con un'emivita di pochi secondi e dà origine rapidamente a numerosi composti (nitri, nitriti, perossinitriti, nitrosotioili, nitrosoproteine). Molte delle azioni svolte dall'NO vengono esercitate dai composti stessi ed inoltre alcuni di essi, come i nitrosotioili e le nitrosoproteine, fungono anche da

riserva di ossido nitrico. A livello delle vie aeree l'NO esercita uno spettro molto ampio di funzioni tra cui le principali sono la modulazione del tono bronchiale, la stimolazione della funzionalità ciliare e l'inibizione della replicazione virale (1). Risale al 1993 la prima segnalazione che i pazienti asmatici presentano valori aumentati di ossido nitrico esalato (FE_{NO}) (2). Tale riscontro è stato poi confermato da numerosi studi sia nell'adulto che in età pediatrica, che hanno mostrato come tale biomarker si associ alla presenza di flogosi eosinofila delle vie aeree e si modifichi in risposta alla terapia steroidea (3, 4).

Per la misura del FE_{NO} in età pediatrica sono disponibili Linee Guida internazionali. La tecnica prevede che il bambino inal aria priva di ossido nitrico da un boccaglio fino alla capacità polmonare totale ed esali nello stesso boccaglio mantenendo un flusso di 50 ml/sec per almeno 6 secondi. Questo tipo di misura richiede quindi un certo grado di collaborazione per mantenere l'espiazione a flusso costante e può venire proposta dai 4 anni in poi. Esistono, per ora solo in ambito di ricerca, anche tecniche di misura del FE_{NO} in bambini più piccoli, in cui la misurazione avviene facendo respirare il bambino a volume corrente (5). Lo strumento a chemiluminescenza tradizionalmente usato per la determinazione del FE_{NO} richiede calibrazioni frequenti ed una certa esperienza nell'uso ed è quindi indicato principalmente per laboratori di fisiopatologia respiratoria. Recentemente si è reso disponibile sul mercato anche uno strumento portatile che amplia le prospettive di utilizzo di questo *biomarker* a livello ambulatoriale ed addirittura domiciliare. I risultati ottenuti con lo strumento portatile presentano una buona concordanza con quelli dello strumento tradizionale (6).

Allo stato attuale le Linee Guida non includono intervalli di riferimento definiti. Tuttavia nel 2005 sono stati pubblicati valori di FE_{NO} ricavati da uno studio multicentrico condotto su 400 bambini sani (età 4-17 anni). Sono stati stimati i valori massimi di normalità che risultano compresi tra 15 ppb per i bambini più piccoli e 25 ppb per gli adolescenti. Complessivamente l'intervallo dei valori normali riportato in questa popolazione di bambini sani è risultato compreso tra 5 e 25 ppb (7).

Nell'eseguire la misura bisogna comunque tenere in considerazione che alcune manovre quali l'esecuzione di spirometria, i test di broncoprovocazione, test da sforzo o l'induzione dell'espettorato possono ridurre transitoriamente i valori di FE_{NO} (8, 9).

I valori di FE_{NO} sono inoltre influenzati anche da altri fattori tra cui la razza (i soggetti non caucasici presentano valori più elevati), l'assunzione di alcol o il fumo di sigaretta (che ne riducono transitoriamente i valori) e le infezioni respiratorie, che fanno invece aumentare l'ossido nitrico esalato (7, 10-12). Quest'ultimo correla inoltre con la presenza di atopia in modo indipendente dalla presenza di manifestazioni allergiche a carico delle basse vie respiratorie (13).

Impiego dell'ossido nitrico nella pratica clinica

FE_{NO} e asma

La patologia per cui si dispone di maggiori evidenze ed esperienza nell'applicazione della misura dell'ossido nitrico esalato è l'asma. In questa patologia la valutazione del FE_{NO} aiuta a distinguere fra diversi fenotipi di flogosi bronchiale e può essere utile per individualizzare ed ottimizzare la terapia steroidea.

L'NO è infatti aumentato nell'aria esalata dei pazienti asmatici come conseguenza dell'induzione dell'isoforma inducibile dell'ossidonitricosintetasi (iNOS) da parte di numerose citochine proinfiammatorie. I suoi valori correlano con gli eosinofili dello sputo, del liquido di broncolavaggio, delle biopsie bronchiali (3, 14). I farmaci corticosteroidi riducono l'NO in modo dose-dipendente per un'inibizione diretta della trascrizione dell'iNOS e per una riduzione delle citochine che ne inducono l'espressione (15, 16). Il montelukast (appartenente alla classe degli antagonisti recettoriali dei leucotrieni) riduce il FE_{NO} in modo indipendente dagli steroidi con un'efficacia tuttavia minore (17).

Quando cominciare una terapia con steroidi inalatori?

Nella pratica clinica la scelta di iniziare una terapia con corticosteroidi per via inalatoria si basa sul presupposto che la presenza di sintomi o di una disfunzione ventilatoria ostruttiva alle prove di funzionalità siano espressione di infiammazione bronchiale. Tuttavia la relazione tra sintomi, funzionalità respiratoria ed infiammazione delle vie aeree è debole (18) e non tutti i tipi di flogosi bronchiale rispondono alla terapia steroidea (19). La definizione di asma bronchiale comprende infatti un gruppo di condizioni eterogenee tra cui l'asma allergico e quello non allergico, l'asma espressione di un meccanismo prettamente neurogenico e quello determinato dalla presenza di infiammazione bronchiale di tipo eosinofilo o neutrofilico.

Il razionale dell'introduzione della misura dell'ossido nitrico nell'aria esalata nella pratica clinica consiste quindi nel fatto che esso rappresenta un marcatore indiretto di infiammazione eosinofila delle vie aeree, la quale è caratteristicamente sensibile agli steroidi (20).

Questo è stato confermato da uno studio che ha mostrato come la misura del FE_{NO} sia in grado di predire il successo di una terapia con ICS in bambini con asma lieve o moderato. I soggetti infatti con

ossido nitrico esalato elevato prima di cominciare la terapia hanno una probabilità maggiore di rispondere e di mantenere un buon controllo della malattia con la terapia steroidea (21, 22).

Come modulare la terapia steroidea?

La valutazione diretta della flogosi nella gestione della malattia asmatica potrebbe inoltre contribuire a razionalizzare l'uso degli steroidi con l'intento di ridurre il numero di riacutizzazioni utilizzando la dose minima sufficiente di farmaco. Si ridurrebbe così anche il rischio di effetti collaterali, direttamente correlati al dosaggio e di particolare rilievo nell'uso protratto in età pediatrica (23).

In questa direzione è stato condotto uno studio di Green che ha incluso la conta degli eosinofili nello sputo indotto nella valutazione di un gruppo di pazienti asmatici. Questa modalità ha permesso di ridurre il numero di esacerbazioni a parità di dosaggio complessivo di ICS (24).

Tuttavia l'induzione dello sputo presenta limitate possibilità di una routinaria applicazione nella pratica clinica ambulatoriale per i tempi, le infrastrutture richieste e la bassa percentuale di successo nell'ottenere un campione adeguato nei bambini. L'ossido nitrico, pur con i limiti di essere un marcatore indiretto di flogosi eosinoflica, presenta il duplice vantaggio di essere assolutamente non invasivo, semplice nell'esecuzione e di fornire risultati immediati disponibili già durante la visita che possono essere utilizzati in modo complementare all'anamnesi, alle prove di funzionalità respiratoria ed all'esame obiettivo. Alcuni studi che hanno considerato la sua introduzione nei percorsi decisionali dei pazienti asmatici hanno mostrato che questa pratica è in grado di migliorare l'*outcome* dei pazienti o di ridurre il dosaggio complessivo di ICS a parità di *outcome* (25, 26). Uno studio di Smith ha mostrato infatti una riduzione di circa il 40% nella dose di steroidi inalatori utilizzata per ottenere un controllo sovrapponibile delle riacutizzazioni asmatiche quando veniva usata la misura del FE_{NO} come guida nella prescrizione di steroidi (370 μ g di fluticasone/die al posto di 640/die) (25).

Un ulteriore studio ha confermato l'utilità della misura del FE_{NO} nella gestione dell'asma in età pediatrica. Se veniva utilizzato infatti anche questo dato per modulare la dose di ICS si otteneva un analogo controllo dei sintomi ma una riduzione dell'iperreattività bronchiale con dosi cumulative equivalenti di steroidi (26).

Tuttavia tali dati non sono univocamente confermati. Un recente studio non ha infatti evidenziato un impatto sugli *outcome* clinici in bambini seguiti anche con la misura FE_{NO} , che hanno di converso utilizzato una dose cumulativa maggiore di steroidi rispetto a pazienti seguiti unicamente con valutazione clinica e funzionale (27).

È opinione condivisa che una volta raggiunto un buon controllo clinico e funzionale della malattia la dose degli steroidi inalatori debba essere progressivamente ridotta alla dose minima efficace. Tuttavia la valutazione di sintomi e spirometria sembra fornire un'informazione non esaustiva e l'inclusione nel protocollo decisionale di un marcatore di infiammazione fornirebbe un aiuto nella scelta di scalare la terapia, individuando quali pazienti potrebbero presentare più probabilmente una ricaduta alla riduzione del dosaggio. Tale aspetto è stato confermato da uno studio dove l'assenza di eosinofili allo sputo e bassi valori di FE_{NO} aiutava ad individuare quali pazienti non avrebbero presentato una riacutizzazione allo scalo della terapia (28). Se queste evidenze supportano il ruolo del FE_{NO} come guida nella riduzione del dosaggio degli ICS, valori aumentati di FE_{NO} non costituiscono invece indicazione a aumentare la terapia in un paziente asintomatico (4).

Alla sospensione della terapia chi ricadrà?

La valutazione del FE_{NO} al raggiungimento di una stabile remissione clinica, quando si decide di sospendere gli ICS, non si è dimostrato predittivo del successivo decorso (29). Tuttavia il suo monitoraggio periodico dopo la sospensione sembra in grado di predire lo sviluppo di riacutizzazioni. Uno studio ha monitorato infatti l'andamento di un gruppo di bambini asmatici per 6 mesi dopo la sospensione della terapia steroidea. I bambini che hanno sviluppato una riacutizzazione della malattia nel corso del *follow-up* avevano presentato un graduale progressivo aumento del FE_{NO} , pur in assenza di sintomi. Partendo con valori sovrapponibili di FE_{NO} al momento della sospensione degli steroidi, dopo 2 e 4 settimane i bambini che avrebbero presentato una ricaduta mostravano infatti valori di FE_{NO} significativamente più elevati (medie di 40,8 e 15,9 ppb a 4 settimane rispettivamente nei due gruppi).

Compliance

La spiccata sensibilità dell'ossido nitrico agli steroidi permette di sfruttare questo strumento anche per il monitoraggio della *compliance* dei pazienti (30).

Livelli elevati di FE_{NO} in un paziente asmatico sintomatico, infatti, indicano verosimilmente un trattamento con steroidi inalatori inadeguato, la cui causa più comune, una volta verificata la correttezza della tecnica inalatoria, risiede in una scarsa *compliance*. Vanno comunque escluse cause quali un'infezione respiratoria intercorrente, l'esposizione antigenica o l'effettiva necessità che il paziente richieda dosi più elevate di steroidi inalatori o uno steroide per bocca per raggiungere il controllo. Sono segnalate, anche se rare, forme di reale steroide-resistenza (31).

Il bambino con asma di difficile controllo

Nella pratica ambulatoriale l'impiego della misura del FE_{NO} può essere utile nella gestione del bambino con asma di difficile controllo. In questo caso la presenza di valori normali di NO nonostante la persistenza dei sintomi rendono improbabile la presenza di flogosi eosinoflica alla radice di essi, rendendo necessario riconsiderare una serie di cofattori (ad esempio sinusite e reflusso gastroesofageo) o diagnosi differenziali quali la sindrome da iperventilazione o malformazioni delle vie aeree. Spesso queste condizioni possono coesistere in uno stesso paziente e la misura dell'ossido nitrico può aiutare nel sopprimerle in diversi

momenti l'importanza relativa (4, 32) (Tabella 1). Rimangono però ancora nodi importanti da sciogliere per introdurre la misura del FE_{NO} nei protocolli di gestione dell'asma. Uno di essi riguarda l'individuazione di cut-off decisionali adeguati. I valori di riferimento disponibili riguardano pazienti sani o con asma lieve o moderato, ma non è noto se si possano applicare anche a quelli con asma più grave che potrebbero avere FE_{NO} "basali" diversi. I valori intermedi rimangono ancora di difficile interpretazione clinica. Inoltre le variazioni di NO che predicono un'esacerbazione sono molto diverse da paziente a paziente e l'ideale probabilmente sarebbe disporre di una soglia indicativa individualizzata per il singolo paziente e non porsi come obiettivo la generica normalizzazione del FE_{NO} (Tabella 2).

FE_{NO} e le altre patologie respiratorie

Sintomatologia respiratoria aspecifica

Oltre che nel *follow-up* dei pazienti asmatici la misura del FE_{NO} è stata proposta tra le indagini di work-up diagnostico dei pazienti con sintomi respiratori aspecifici. La valutazione del FE_{NO} nel paziente con sintomatologia respiratoria cronica presenta infatti una buona sensibilità e specificità

Tabella 1 Ossido nitrico esalato nel paziente asmatico in terapia con steroide inalatorio. ICS, steroidi inalatori; PCD, discinesia ciliare primitiva; FC, fibrosi cistica; BPD, broncodisplasia; RGE, reflusso gastroesofageo; LABA, β_2 a lunga durata d'azione; LTRA, antagonista recettoriale dei leucotrieni. Modificata da (4).

| FE_{NO} (ppb) | Flogosi eosinoflica | Significato nella gestione di pazienti asmatici in terapia con ICS |
|-----------------|---------------------|---|
| <25 | Improbabile | <p><u>Se sintomatici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Riconsiderare la diagnosi (broncospasmo post-infettivo, RGE, malformazioni congenite, FC, BPD, PCD) • Valutare LABA, ciclo di macrolide, teofillina <p><u>Se asintomatici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Buona compliance, valutare la riduzione degli ICS |
| 25-35 | Lieve | <p><u>Se sintomatici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Valutare la compliance e la tecnica inalatoria • Valutare la presenza di infezione o esposizione antigenica • Considerare di aggiungere LABA o LTRA ed eventualmente un aumento degli ICS <p><u>Se asintomatici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Non modifiche della terapia |
| >35 | Significativa | <p><u>Se sintomatici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Valutare la compliance e la tecnica inalatoria • Valutare la presenza di infezione o esposizione antigenica • Considerare di aggiungere LTRA o aumentare ICS • Considerare la resistenza agli steroidi (rara) <p><u>Se asintomatici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Non modifiche della terapia |

Tabella 2 Possibile interpretazione dei valori di ossido nitrico esalato (FE_{NO}) in bambini con sintomatologia respiratoria cronica. PCD, discinesia ciliare primitiva; FC, fibrosi cistica; nNO, ossido nitrico nasale; RGE, reflusso gastroesofageo; BPD, broncodisplasia. Modificata da (4).

| FE_{NO} (ppb) | Flogosi eosinofilica | Possibile interpretazione |
|-----------------|----------------------|---|
| <5 | Improbabile | PCD (valutare nNO) FC |
| 5-25 | Improbabile | Broncospasmo post-infettivo RGE PCD (valutare nNO) Asma con flogosi neutrofilica FC Tracheo-broncomalacia Sinusite Disfunzione delle corde vocali BPD |
| 25-50 | Lieve-moderata | Interpretazione in relazione al quadro clinico |
| >50 | Importante | Asma allergico (diagnosi molto probabile se associato a broncoostruzione reversibile) verosimilmente responsivo agli steroidi |

nella diagnosi di asma allergico (33). Tuttavia va sottolineato come alcuni pazienti che soddisfano i criteri clinici e funzionali per la diagnosi di asma possano avere valori normali di FE_{NO} , soprattutto se non sono atopici. L'NO rappresenta quindi solo un elemento complementare all'anamnesi, alle prove funzionali ed ai test di iperreattività bronchiale nella diagnosi di asma (Tabella 1).

Infezioni virali

I valori di FE_{NO} sono elevati durante le infezioni delle alte e basse vie aeree, sia nei soggetti sani che negli asmatici (12). In particolare sono le infezioni virali a far aumentare il FE_{NO} inducendo l'espressione di iNOS e ciò sembra possa rappresentare un vantaggio per l'ospite in quanto l'ossido nitrico inibisce la replicazione virale (34).

Fibrosi cistica

Nei bambini con fibrosi cistica i valori di FE_{NO} sono normali o ridotti, ma la sovrapposizione che i valori presentano con quelli dei soggetti sani non permette alla misura di questo marcatore di assumere un significato diagnostico (35).

Discinesia ciliare primitiva (PCD)

I valori di ossido nitrico esalato sono più bassi nei soggetti con PCD che in quelli sani, ma possono presentare un certo grado di sovrapposizione con la normalità. I valori di ossido nitrico nasale (nNO)

sono invece estremamente bassi nei bambini con PCD e sono in grado di differenziare nettamente soggetti sani da soggetti affetti con sensibilità e specificità superiori al 90%. Tale test presenta quindi le caratteristiche ideali per essere usato come screening della malattia. Bisogna comunque tenere presente che valori ridotti di nNO e FE_{NO} si potrebbero registrare anche in soggetti con sinusite o bronchiectasie senza discinesia ciliare primitiva (36).

Conclusioni

In conclusione la misura dell'ossido nitrico può apportare un contributo nel formulare la diagnosi in pazienti con sintomatologia respiratoria aspecifica, nella discinesia ciliare primitiva e nell'asma. Può inoltre contribuire a modulare la terapia steroidea e monitorare nel tempo i pazienti asmatici. Il riscontro di valori elevati di ossido nitrico in un paziente asmatico asintomatico vanno comunque valutati in un contesto clinico complessivo e non richiedono di per se stessi una terapia. Un aumento del FE_{NO} dopo la sospensione degli steroidi in pazienti con asma in remissione è tuttavia predittivo di ripresa di malattia e livelli elevati di ossido nitrico esalato in un paziente asmatico sintomatico indicano verosimilmente un trattamento con steroidi inalatori inadeguato, spesso per una tecnica d'uso degli inalatori non corretta o una scarsa compliance.

Bibliografia

1. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system.* *Physiol Rev* 2004; 84: 731-765.
2. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. *Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics.* *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-1370.
3. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, et al. *Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children.* *Eur Respir J* 1999; 13: 1386-1390.
4. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. *Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation.* *Thorax* 2006; 61: 817-827.
5. Baraldi E, De Jongste JC on behalf of the task force. *ERS/ATS statement. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001.* *Eur Respir J* 2002; 20: 223-237.
6. Hemmingsson T, Linnarsson D, Gambert R. *Novel hand-held device for exhaled nitric oxide-analysis in research and clinical applications.* *J Clin Monit Comput* 2004; 18: 379-387.
7. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, et al. *Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years.* *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1130-1136.
8. Deykin A, Halpern O, Massaro AF, et al. *Expired nitric oxide after bronchoprovocation and repeated spirometry in patients with asthma.* *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 769-775.
9. Beier J, Beeh KM, Kornmann O, Buhl R. *Sputum induction leads to a decrease of exhaled nitric oxide unrelated to airflow.* *Eur Respir J* 2003; 22: 354-357.
10. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, et al. *The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide.* *Eur Respir J* 1996; 9: 1130-1133.
11. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, et al. *Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide.* *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 609-612.
12. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. *Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections.* *Eur Respir J* 1995; 8: 295-297.
13. Brussee JE, Smith HA, Kerckhof M, et al. *Exhaled nitric oxide in 4-year old children: relationship with asthma and atopy.* *Eur Respir J* 2005; 25: 455-461.
14. Van den Toorn LM, Overbeek SE, De Jongste JC, et al. *Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma.* *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2107-2113.
15. Baraldi E, Azzolin NM, Zanconato S, et al. *Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma.* *J Pediatr* 1997; 24: 312-318.
16. Jones SL, Herbison P, Cowan JO, et al. *Exhaled NO and assessment of anti-inflammatory effects of inhaled steroid: dose response relationship.* *Eur Respir J* 2002; 20: 601-608.
17. Bisgaard H, Loland L, Oj JA. *NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast.* *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1227-1231.
18. Sont JK, Han J, van Krieken JM, et al. *Relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsy specimens and clinical severity of asthma in patients treated with inhaled steroids.* *Thorax* 1996; 51: 496-502.
19. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al. *Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids.* *Thorax* 2002; 57: 875-879.
20. Lim S, Jatakanon A, John M, et al. *Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma.* *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 59: 22-30.
21. Szefer SJ, Philips BR, Martinez FD, et al. *Characterization of within subjects responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma.* *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 233-242.
22. Zeiger RS, Szefer SJ, Phillips BR, et al; Childhood Asthma Research and Education Network of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Response profiles to fluticasone and montelukast in mild-to-moderate persistent childhood asthma.* *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 45-52.

- 23.** Powell H, Gibson PG. *Inhaled corticosteroid doses in asthma: an evidence based approach.* Med J Aust 2003; 178: 223-225.
- 24.** Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial.* Lancet 2002; 360: 1715-1721.
- 25.** Smith AD, Cowan GO, Brassett KP, et al. *Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma.* N Engl J Med 2005; 352: 2163-2173.
- 26.** Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, De Jongste JC. *Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomised controlled trial.* Am J Respir Crit Care Med 2005; 172: 831-836.
- 27.** Fritsch M, Uxa S, Horak F Jr, et al. *Exhaled nitric oxide in the management of childhood asthma: a prospective 6-months study.* Pediatr Pulmonol 2006; 41: 855-862.
- 28.** Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, et al. *Clinical use of noninvasive measurements of airway-inflammation in steroid reduction in children.* Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 1077-1082.
- 29.** Pijnenburg MW, Hofhius W, Hop WC, De Jongste JC. *Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical remission.* Thorax 2005; 60: 215-218.
- 30.** Katsara M, Donnelly D, Iqbal S, et al. *Relationship between exhaled nitric oxide levels and compliance with inhaled corticosteroids in asthmatic children.* Respir Med 2006; 100: 1512-1517.
- 31.** Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, et al. *Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone.* Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 1376-1381.
- 32.** Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. *Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests.* Am J Respir Crit Care Med 2004; 169: 473-478.
- 33.** Malberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. *Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probably asthma.* Thorax 2003; 58: 494-499.
- 34.** Sanders SP, Proud PD, Permutt S, et al. *Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection.* J Allergy Clin Immunol 2004; 113: 697-702.
- 35.** Franklin PJ, Hall GL, Moeller A, et al. *Exhaled nitric oxide is not reduced in infants with cystic fibrosis.* Eur Respir J 2006; 27: 350-354.
- 36.** Narang I, Ersu R, Wilson NM, et al. *Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance.* Thorax 2002; 57: 586-589.

Il condensato dell'aria espirata in pneumologia pediatrica

Exhaled breath condensate in paediatric pulmonology

Parole chiave: aria esalata, infiammazione, stress ossidativo, condensato

Key words: *exhaled air, inflammation, oxidative stress, condensate*

Riassunto. Per lo studio della fisiopatologia respiratoria è molto importante avere un metodo di campionamento delle vie aeree che sia il più possibile non invasivo e che consenta di ottenere più informazioni nel corso di un singolo esame.

Il condensato dell'aria espirata (CAE) è un fluido ottenuto raffreddando l'aria esalata durante la respirazione a volume corrente ed è una nuova tecnica che può fornire una valutazione della patobiologia polmonare. Il CAE è essenzialmente formato da vapore acqueo, ma anche da una serie di elementi non cellulari che sono espirati sotto forma di bio-aerosol. Si ritiene che questi bio-aerosol siano composti di minuscole gocce formate durante il passaggio dell'aria in/espiratoria sul fluido di rivestimento broncoalveolare.

Il CAE è in grado di portare un ampio spettro di sostanze biologicamente attive e quindi rilevanti per la comprensione dei meccanismi che sono alla base delle malattie respiratorie.

In questa revisione sono riassunte le principali applicazioni che il CAE può avere nell'ambito della pneumologia pediatrica.

Accettato per la pubblicazione il 1 dicembre 2006.

Corrispondenza: Dott. Massimo Corradi, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università di Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma; e-mail: massimo.corradi@unipr.it

Introduzione

Il ruolo fisiologico del polmone è lo scambio di ossigeno ed anidride carbonica, ma nell'aria esalata sono presenti anche altre sostanze, sia gassose che non gassose. Tra le sostanze non gassose, distinguiamo sostanze volatili, sostanze non volatili e semi-volatili (*Tabella 1*). Una sostanza chimica è considerata volatile quando ha la tendenza a passare in fase gas. Una sostanza chimica è considerata non volatile quando ha poca tendenza a passare in fase gas. Le caratteristiche intrinseche della sostanza e le condizioni ambientali sono i fattori che regolano la volatilità. Esempio di sostanze non gassose ma volatili sono alcuni indicatori di ossidazione lipidica quali l'etano e il pentano (1). Si tratta di composti la cui tensione di vapore, alla temperatura corporea, determina un facile passaggio in fase gas nell'aria espirata.

Ci sono poi sostanze quali sali e proteine la cui tensione di vapore è bassa a 37°C, quindi hanno difficoltà a raggiungere l'esalato in fase di gas. Queste sostanze sono meno facilmente rilevabili nell'aria espirata e possono essere espirate in

Tabella 1 Classificazione delle sostanze presenti nell'aria espirata.

| | |
|---------|---|
| Gas | Monossido (Monossido di azoto, monossido di carbonio) |
| Non Gas | Sostanze volatili (etano, pentano, benzene) |
| | Sostanze semi-volatili (acqua ossigenata) |
| | Sostanze non volatili (proteine, sali) |

forma di aerosol, ovvero una sospensione di un liquido (o solido) in un gas (2).

Le sostanze gassose (NO, CO) sono, in genere, misurate on line, ovvero il soggetto espira direttamente entro un analizzatore con risultati immediati. Riguardo alle sostanze non gassose ma volatili, la loro raccolta è eseguita off line, ovvero l'aria esalata è raccolta in appositi contenitori o su fibre assorbenti e successivamente analizzata (3).

Per la raccolta delle sostanze esalate parzialmente o non volatili, la tecnica più utilizzata è il condensato dell'aria esalata (CAE) (4).

Meccanismi di formazione del CAE

L'aria esalata che esce dalla bocca ha una temperatura di circa 35 gradi ed un'umidità del 95%. L'aria esalata è quasi completamente in equilibrio con il vapore acqueo alla temperatura corporea. Quando l'aria esalata impatta su una superficie più fredda rispetto alla temperatura del vapore acqueo, accade il fenomeno della condensazione, cioè la formazione d'acqua liquida dal vapore acqueo puro o d'acqua mescolata con aria.

Il CAE, quindi, è una matrice liquida composta essenzialmente da vapore acqueo condensato. Si stima che la quota di vapore acqueo in esso presente sia di circa 99%. Tuttavia, nel CAE sono determinabili numerose sostanze volatili e non volatili biologicamente attive, il che porta a definire il CAE come una soluzione acquosa. Il meccanismo con cui le sostanze esalate si ritrovano nel CAE non è del tutto chiaro, tuttavia si ipotizza che piccole particelle, probabilmente goccioline che si staccano dal film liquido che riveste le vie respiratorie, rimangono in sospensione nell'aria espirata e siano trasportate dalla corrente di vapore espirata. I fattori che determinano la formazione dell'aerosol non sono stati studiati in dettaglio, anche se è probabile che la tensione superficiale del liquido, la velocità e l'umidità dell'aria inalata, i cambiamenti nella turbolenza espiratoria svolgano un ruolo importante.

Il contenuto in acqua dell'aria espirata diminuisce esponenzialmente con il declino della temperatura. A 10°C già l'81,2% del vapore acqueo condensa, mentre a 0°C condensa oltre l'89% di vapore acqueo ed a -10°C condenserà circa il 93,7% del vapore acqueo. Il CAE è pertanto "la componente dell'aria esalata-espirata che precipita e condensa a temperatura compresa tra 0°C e -10°C".

Un'ulteriore importante riduzione della temperatura, utilizzando ad esempio azoto liquido come agente raffreddante non è necessaria, sia perché non porta ad incremento notevole della frazione di condensato, sia perché i costi sarebbero troppo sostenuti rispetto ai benefici. Per ottenere invece una buona quantità di condensato, piuttosto che abbassare ulteriormente la temperatura, è meglio, e decisamente più conveniente, aumentare la superficie di contatto del vapore con la fonte fredda; ciò può essere ottenuto attraverso una determinata geometria del condensatore.

La metodica del CAE rappresenta quindi una modalità di raccolta dell'aria esalata per analisi, attraverso la condensazione dell'aria esalata stessa.

Raccolta del CAE

La raccolta del CAE non altera le mucose delle vie aeree e non comporta una variabile diluizione dei campioni, come accade invece per i campioni ottenuti mediante broncoscopia e lavaggio broncoalveolare. I pazienti possono essere studiati a qualunque età ed inoltre il CAE è particolarmente indicato per il monitoraggio, mediante misure sequenziali e longitudinali, in quanto non altera la struttura e lo stato funzionale delle basse vie aeree (Tabella 2). I dati pubblicati sui mediatori della flogosi indicano che il CAE riflette le anomalie notate in campioni ottenuti mediante broncoscopia.

La raccolta del CAE si effettua chiedendo al soggetto di respirare dalla bocca a volume corrente per circa 15 minuti. Prima e durante la manovra, è necessario un attento risciacquo del cavo orale, preferibilmente con acqua distillata. L'aria esalata è raffreddata in appositi condensatori. Il volume di CAE ottenuto in 15 minuti è circa 1 ml, tuttavia la ventilazione polmonare è il principale fattore che regola il volume di CAE prodotto. Un altro fattore molto rilevante è la temperatura di raffreddamento dell'aria esalata, in grado di condizionare

Tabella 2 Vantaggi del CAE.

| |
|-------------------------------|
| Raccolta non-invasiva |
| Semplice e veloce |
| Applicabile in pazienti gravi |
| Adatta a bambini piccoli |
| Manovra non flogogena |
| Matrice acquosa |
| Non richiede manipolazioni |





quantità e composizione del liquido raccolto. Goldoni et al. (5) hanno dimostrato una chiara relazione inversa tra volume di CAE prodotto e temperatura di raffreddamento, in un *range* di lavoro da -10° a $+5^{\circ}\text{C}$. Il maggior volume di condensazione lo si aveva a -10°C , ma a ciò corrispondeva anche una maggiore diluizione del soluto, quindi una concentrazione ridotta. Risulta pertanto molto utile la possibilità di termostatare la provetta e raccogliere il condensato alla temperatura più opportuna per ciascun analita (5). Tra i condensatori in commercio, solo il TurboDeccs (ItalChill, Parma, Italia) è provvisto di un termostato per il controllo e la regolazione della temperatura. Di recente, Soyer et al. (6) hanno dimostrato come in un altro sistema di raccolta commerciale, Rtube (Respiratory Research Inc., VA), si assiste ad un significativo aumento della temperatura del condensatore già due minuti dopo il suo trasferimento dal frigorifero alla temperatura ambiente. In un altro condensatore commerciale, EcoScreen (Jaeger, Wurzburg, Germany) la temperatura, al contrario, tende a scendere nel tempo, determinando, quindi, un variabile grado di condensazione, con formazione dapprima di CAE liquido,

poi di CAE ghiacciato (osservazione personale). Un altro delicato aspetto relativo alla raccolta del CAE consiste nella composizione dei sistemi di raccolta. Nel processo di formazione del CAE, minuscole gocce di fluido polmonare impattano contro la superficie del condensatore, mischiandosi poi al vapore acqueo condensato. Alcune sostanze si possono adsorbire al sistema di raccolta, oppure il sistema di raccolta stesso, anche durante eventuali fasi di sterilizzazione, può rilasciare sostanze interferenti con i meccanismi di analisi del CAE. Risulta, quindi, estremamente importante valutare fenomeni di rilascio e di adsorbimento dei sistemi di raccolta utilizzati (7). In *tabella 3* sono riportati i principali condensatori artigianali e presenti sul mercato, con i relativi vantaggi e svantaggi.

La ricerca si sta focalizzando verso condensatori sempre più efficienti e dotati di sistemi per il frazionamento dell'aria espirata.

È possibile raccogliere il CAE anche in bambini connessi a ventilatore, posizionando il condensatore in serie al circuito respiratorio. Muller et al. (8) hanno determinato l'8-isoprostano nel CAE di bambini

Tabella 3 Sistemi di raccolta del condensato dell'aria esalata.

| Condensatore | Nome commerciale | Vantaggi | Svantaggi |
|---|------------------|--|--|
|  | Non disponibile | Basso costo, buona efficienza di condensazione, portatile | Non monouso, temperatura non controllata, nessun frazionamento dell'aria esalata, materiale non inerte |
|  | Rtube | Basso costo, portatile, monouso, adattabile al ventilatore | Temperatura non controllata, nessun frazionamento dell'aria esalata, costo del monouso |
|  | Turbo Deccs | Portatile, costo modesto, monouso, temperatura di raffreddamento costante e regolabile | Costo del monouso, nessun frazionamento dell'aria esalata |
|  | EcoScreen | Adattabile al ventilatore, sistema di raccolta teflonato, semplice raccordo per spirometro | Costo elevato, non monouso, temperatura non controllata, nessun frazionamento dell'aria esalata |

intubati dimostrando che la quantità di CAE prodotta era chiaramente proporzionale alla ventilazione minuto. Tuttavia, la presenza dell'umidificatore annesso al ventilatore causava una maggiore diluizione del campione, determinando quindi livelli di 8-isoprostano al di sotto del limite di rilevabilità.

Dati interessanti sono stati pubblicati relativamente alla possibilità di misurare il perossido di idrogeno nel CAE di infanti pretermine; Hitka et al. (9) hanno dimostrato una progressiva riduzione dei livelli di perossido di idrogeno nel CAE di bambini pretermine a seguito di ossigenoterapia.

Infine, il CAE può essere raccolto anche nei latranti durante il sonno (10), tramite una maschera naso-boccale connessa al condensatore.

Analisi del CAE

La raccolta del CAE è effettuata per due obiettivi importanti:

1. avere informazioni sui meccanismi fisiopatologici nelle vie aeree rilevando i cambiamenti nei livelli dei mediatori;
2. avere informazioni sulla composizione del fluido di rivestimento broncoalveolare.

Sono numerose le sostanze che possono essere valutate nel CAE (Tabella 4), tra cui molecole di modeste dimensioni quali perossido di idrogeno e molecole di dimensioni maggiori quali leucotrieni, prostaglandine, citochine, isoprostani, marker tumorali e piccole quantità di DNA.

Le metodiche più utilizzate per la determinazione dei differenti mediatori sono di tipo colorimetrico ed immunoenzimatico. Negli ultimi anni, comunque, al fine di ottenere una maggiore specificità delle analisi, metodiche che utilizzano la cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, sono sempre più spesso utilizzate per le analisi del CAE. Per la maggior parte delle sostanze dosabili nel CAE, la misura può essere fatta sul campione non manipolato. Tuttavia, per alcuni analiti è necessaria una processazione del campione prima dell'analisi. Alcune sostanze sono piuttosto labili nel CAE, anche se conservate a basse temperature. È il caso del perossido di idrogeno, che va dosato su campioni appena raccolti oppure è necessario aggiungere una sostanza stabilizzante (acido idrossifenilacetico) per una prolungata conservazione del campione (11). Per l'analisi del pH, è necessario, invece, fare gorgogliare all'interno del CAE un gas inerte (in genere Argon) per alcuni minuti, al fine

di rimuovere le sostanze volatili (soprattutto anidride carbonica) e poter quindi calcolare l'acidità fissa. Per altre sostanze, quali ad esempio alcune citochine, è spesso necessaria una concentrazione del campione, in genere ottenuta tramite liofilizzazione, al fine di consentire una migliore rilevabilità.

Applicazioni cliniche

Acqua ossigenata

L'acqua ossigenata (H_2O_2) è un valido indicatore di stress ossidativo, che si forma in seguito all'attivazione di radicali liberi. Si tratta di una molecola parzialmente volatile che si misura facilmente nell'aria espirata a concentrazione micromolare (μM), con rilevazione fluorimetrica (12).

L' H_2O_2 nel CAE è ampiamente utilizzata nell'ambito della ricerca in pneumologia pediatrica. Una prima sua concreta applicazione si è avuta nel 1997, quando Jobsis et al. (13) hanno dimostrato un incremento dei livelli di H_2O_2 nel CAE di bambini asmatici rispetto ai soggetti di controllo, indipendentemente dalla presenza di terapia inalatoria con cortisone. L'anno successivo lo stesso gruppo (14) ha definito i livelli di normalità in età pediatrica di questo indicatore, con un intervallo di riferimento da $<0,01$ a $0,48 \mu M$. Inoltre, gli autori hanno dimostrato una buona riproducibilità delle misure e la possibilità di conservare il CAE. L' H_2O_2 è stata anche dosata nel CAE di bambini con fibrosi cistica (FC). Il gruppo olandese (15) ha rilevato livelli elevati di H_2O_2 nel CAE di bambini durante una

Tabella 4 Principali sostanze determinabili nel CAE.

| Indicatore | Significato biologico | Determinazione |
|---|--|----------------------------------|
| Acqua ossigenata | Generazione di radicali liberi | Fluorimetria |
| pH | Equilibrio acido base, reflusso gastrico | pHmetro |
| Eicosanoidi (leucotrieni, prostaglandine) | Infiammazione, stress ossidativo | Immunoenzimatica, cromatografica |
| Aldeidi/isoprostani | Stress ossidativo | Cromatografica |
| NOx | Stress nitrosoattivo | Colorimetrica, cromatografica |
| Conducibilità | Fattore di diluizione | Conducimetro |
| Citochine | Infiammazione | Immunoenzimatica |

riacutizzazione di fibrosi cistica, con successiva riduzione dei livelli dopo trattamento antibiotico. Da questi primi dati era, quindi, emerso che condizioni associate ad infiammazione acuta (16) o cronica (13) delle vie aeree sono caratterizzate dalla presenza di elevati livelli di H_2O_2 esalata, apparentemente non influenzati dalla terapia inalatoria con cortisone, ma ridotti dalla terapia orale con antibiotici.

Eicosanoidi

Sono rappresentati da diverse famiglie di sostanze (prostaglandine, trombossani, leucotrieni, lipossine, etc.) derivate dall'acido arachidonico, che hanno la capacità di aumentare le reazioni allergiche, la proliferazione cellulare, la pressione sanguigna, le reazioni infiammatorie, l'aggregazione piastrinica, la trombogenesi e il vasospasmo.

I leucotrieni sono le sostanze più spesso determinate nel CAE a concentrazione di picogrammi, sia con metodiche immunoenzimatiche che con spettrometria di massa. I più studiati sono i cisteinil leucotrieni (cLT), ovvero i leucotrieni C₄, D₄ ed E₄, che sono i responsabili della fase ritardata della reazione asmatica, ed il leucotriene B₄, un metabolita flogogeno prodotto a livello dei granulociti neutrofili.

Esistono varie evidenze a favore della presenza di elevati livelli di cLT nel CAE di bambini asmatici (17) con una certa correlazione positiva tra livello del mediatore e gravità clinica (18) ed un ulteriore aumento nei livelli nel corso di riacutizzazione (19). I livelli di cLT sembrano, inoltre, essere particolarmente utili per lo studio di alcune particolari forme d'asma, quali l'asma indotta da esercizio fisico e l'asma da aspirina. Carraro et al. (20) hanno dimostrato come i livelli di cLT nel CAE sono elevati in bambini con asma indotta da esercizio fisico, con una correlazione positiva tra i livelli basali del mediatore e caduta del FEV₁ dopo esercizio. Antczak et al. (21) hanno dimostrato come l'asma indotta da aspirina sia associata ad elevati livelli di cLT nel CAE. Un'altra interessante applicazione dell'utilizzo del cLT nel CAE di bambini asmatici si è avuta dal gruppo londinese di Lex et al. (22), i quali hanno mostrato una correlazione positiva tra i livelli espirati di cLT e lo spessore della membrana basale di biopsie bronchiali, proponendo, quindi, questa determinazione come metodo per lo studio del rimodellamento delle vie aeree caratteristico dell'asma bronchiale.

Un altro utilizzo dei cLT nel CAE è la valutazione della risposta farmacologica. Biernacki et al. (23) hanno dimostrato una riduzione tempo dipendente nei livelli di cLT in asmatici dopo terapia con antileucotrieni.

Il leucotriene B₄ (LTB₄) è stato anch'esso ampiamente studiato nel CAE di bambini. I livelli di LTB₄ sono anch'essi elevati nel CAE di bambini asmatici (24), ma la principale sua applicazione riguarda la fibrosi cistica. Bodini et al. hanno mostrato livelli elevati di LTB₄ nel CAE di bambini con fibrosi cistica, soprattutto se presente una colonizzazione batterica con *Pseudomonas aeruginosa* (15).

Di recente, Bonetto et al. (26) hanno pubblicato un interessante articolo concernente la possibilità di utilizzare LTB₄ nel CAE per valutare l'insulto polmonare provocato da sostanze pneumotossiche inalate.

pH

La misura del pH nel CAE ha subito attratto notevole interesse, nell'ipotesi che l'acidificazione polmonare provocata dal processo infiammatorio possa rappresentare un nuovo approccio verso la conoscenza della fisiopatologia polmonare. Nel 2003 Hunt et al. hanno per primi dimostrato come il CAE di soggetti asmatici durante una crisi d'asma sia notevolmente più acido (circa 5) rispetto ai valori di controllo (circa 7,5) (27). Il pH si determina facilmente nel CAE, sembra essere molto riproducibile (28) e non influenzato dalla produzione orale d'ammoniaca (29). Anche nei bambini con asma in fase clinicamente stabile si osservano livelli di pH ridotti rispetto ai controlli (30).

Un'acidificazione delle vie aeree è stata anche riportata in bambini con fibrosi cistica (31), con un'ulteriore acidificazione durante la riacutizzazione (32). Tuttavia, non è ancora ben chiaro quanto le modifiche di pH che si osservano nel CAE dipendano da una reale alterazione delle vie aeree, oppure non riflettano modifiche della flora batterica orale (33) o la presenza di reflusso gastroesofageo (34).

NO_x

Vari ossidi di azoto (NO_x) sono stati determinati nel CAE, quali nitrati/nitriti, nitrosotoli e nitrotirosina. Nitrati/nitriti sono lievemente elevati nel CAE di bambini asmatici, ma soprattutto si assiste ad un incremento nei loro livelli nei soggetti con fibrosi cistica, in contrapposizione ai livelli di

NO che sono quasi diagnosticamente ridotti (35). Sembra, inoltre, interessante la possibilità di utilizzare la misura di NOx nella valutazione della risposta polmonare all'immunoterapia specifica, come di recente pubblicato da Inci et al. (36).

L'applicazione della misura di NOx nel CAE di soggetti con asma bronchiale sembra essere meno promettente rispetto alla determinazione di NO gas; tuttavia, recenti osservazioni sembrano in parte confutare questa tesi, dimostrando come il dosaggio di tutti gli NOx nell'aria esalata, non solo quindi NO gas, possa permettere una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici associati all'asma bronchiale (37).

Un altro interessante indicatore di stress nitrosoattivo è la nitrotirosina, prodotta dalla reazione dello NO con l'anione superossido. Baraldi et al. hanno evidenziato elevati livelli di nitrotirosina/tirosina nel CAE di bambini asmatici rispetto ai soggetti di controllo (38).

8-isoprostano e aldeidi

Si tratta di validi indicatori di ossidazione lipidica in vivo, facilmente determinabili nel CAE. Gli isoprostani sono una famiglia di eicosanoidi di origine non enzimatica prodotta dall'ossidazione casuale dei fosfolipidi dei tessuti. L'ossidazione di questi fosfolipidi è la maggior parte delle volte causata dai radicali liberi dell'ossigeno.

Livelli elevati di 8-isoprostano sono stati determinati nel CAE di bambini con asma in fase stabile (39), fibrosi cistica e discinesia ciliare primaria (40, 41). Nell'asma bronchiale, i livelli di 8-isoprostano nel CAE sembrano avere una buona correlazione positiva con la gravità clinica, mentre sembrano relativamente resistenti alla terapia con steroidi inalati (18).

Sembra anche interessante la possibilità di dosare l'8-isoprostano nel CAE di bambini ventilati meccanicamente, ricordando tuttavia che l'umidificazione aggiunta al ventilatore causa una marcata diluizione del campione con conseguente riduzione dei livelli di 8-isoprostano al di sotto dei limiti di rilevabilità (8).

Riguardo alle differenti aldeidi presenti nel CAE, la malondialdeide (MDA) è la forma più stabile e più clinicamente rilevante. Corradi et al. hanno evidenziato un aumento nei livelli di MDA in bambini asmatici durante una riacutizzazione, ed un rapporto negativo tra livelli di MDA nel CAE e concentrazione di glutazione ridotto (42).

Citochine

La possibilità di determinare citochine nel CAE è sicuramente molto interessante, dato l'enorme rilevanza fisiopatologica che questi indicatori possono avere per la comprensione delle patologie respiratorie. Purtroppo, le concentrazioni delle citochine nel CAE sono molto basse, il che richiede metodi molto sensibili per le analisi, oppure la concentrazione del campione. In un recente lavoro, livelli di diverse citochine a pattern TH1 e TH2 sono state dosate nel CAE di bambini con asma e con fibrosi cistica. IL-2, IL-4, IFN-gamma, e IL-10 erano determinabili nel 16%, 16%, 11%, e 9%, rispettivamente di tutti i campioni di asma e FC. Nei controlli IFN-gamma, TNF-alpha, e IL-10 erano dosabili in 9%, 14%, e 3%, rispettivamente; IL-2, IL-4, e IL-5 non erano determinabili nei controlli (43). IL-8 e IL-6 sono più facilmente misurabili nel CAE. Bodini et al. hanno evidenziato come i livelli di IL-8 sono dosabili nel CAE di bambini con fibrosi cistica, e le rispettive concentrazioni sono più elevate in quei bambini con colonizzazione batterica delle vie aeree (44).

Conducibilità

La conduttanza (o, più raramente, conducibilità elettrica) è l'espressione quantitativa dell'attitudine di un conduttore ad essere percorso da corrente elettrica. Questo parametro è calcolato nel CAE per stabile la quantità di soluto presente nella soluzione. Il parametro, come tale, non sembra avere un'importanza clinica; la sua utilità, invece, potrebbe derivare dal suo utilizzo come indicatore di diluizione. Infatti, considerando che la maggior parte del CAE è acqua, potrebbe essere utile avere una stima di quanto i soluti in esso presenti siano diluiti, al fine di poter meglio interpretare un'eventuale variazione della concentrazione dell'indicatore selezionato (45).

Conclusioni

I dati pubblicati indicano che il CAE è una metodica di semplice esecuzione e non invasiva, caratteristiche che la rendono facilmente applicabile per lo studio delle patologie polmonari nei bambini. Di recente sono state pubblicate Linee Guida e raccomandazioni (46) che possono permettere una maggiore standardizzazione della metodica e quindi una più facile confrontabilità dei dati ottenuto nei differenti centri di ricerca.

Bibliografia

1. Barker M, Hengst M, Schmid J, et al. *Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis*. *Eur Respir J* 2006; 27: 929-936.
2. Effros RM, Peterson B, Casaburi R, et al. *Epithelial lining fluid solute concentrations in chronic obstructive lung disease patients and normal subjects*. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1286-1292.
3. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. *Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 6-14.
4. Hunt J. *Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease*. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 28-34.
5. Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, et al. *Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters*. *BMC Pulm Med* 2005; 5: 10.
6. Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, et al. *Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection*. *Allergy* 2006; 61: 1016-1018.
7. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, et al. *Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate*. *Eur Respir J* 2006; 28: 1036-1041.
8. Muller WG, Morini F, Eaton S, et al. *Safety and feasibility of exhaled breath condensate collection in ventilated infants and children*. *Eur Respir J* 2006; 28: 479-485.
9. Hitka P, Cerny M, Vizek M, et al. *Assessment of exhaled gases in ventilated preterm infants*. *Physiol Res* 2004; 53: 561-564.
10. Moeller A, Franklin P, Hall GL, et al. *Measuring exhaled breath condensates in infants*. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 184-187.
11. Wewel AR, Crusius JA, Gatzemeier U, et al. *Time course of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide during chemotherapy*. *Eur Respir J* 2006; 27: 1033-1039.
12. Gerritsen WB, Zanen P, Bauwens AA, et al. *Validation of a new method to measure hydrogen peroxide in exhaled breath condensate*. *Respir Med* 2005; 99: 1132-1137.
13. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. *Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children*. *Eur Respir J* 1997; 10: 519-521.
14. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. *Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values*. *Eur Respir J* 1998; 12: 483-485.
15. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. *Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment*. *Eur Respir J* 2000; 16: 95-100.
16. Jobsis RQ, Schellekens SL, Fakkell-Kroesbergen A, et al. *Hydrogen peroxide in breath condensate during a common cold*. *Mediators Inflamm* 2001; 10: 351-354.
17. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, et al. *Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1345-1349.
18. Zanconato S, Carraro S, Corradi M, et al. *Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 257-263.
19. Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, et al. *Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations*. *Thorax* 2003; 58: 505-509.
20. Carraro S, Corradi M, Zanconato S, et al. *Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes are increased in children with exercise-induced bronchoconstriction*. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 764-770.
21. Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S, et al. *Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 301-306.
22. Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN, et al. *Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study*. *Respir Res* 2006; 7: 63.
23. Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM, Barnes PJ. *Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients*. *Chest* 2005; 128: 1958-1963.

- 24.** Montuschi P, Martello S, Felli M, et al. *Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B₄ in asthmatic children.* Respir Res 2005; 6: 119.
- 25.** Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, et al. *Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections.* Pediatr Pulmonol 2005; 40: 494-499.
- 26.** Bonetto G, Corradi M, Carraro S, et al. *Longitudinal monitoring of lung injury in children following chlorine exposure in a swimming pool.* Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 545-549.
- 27.** Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. *Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology.* Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 694-699.
- 28.** Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, et al. *Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity.* Eur Respir J 2003; 22: 889-894.
- 29.** Wells K, Vaughan J, Pajewski TN, et al. *Exhaled breath condensate pH assays are not influenced by oral ammonia.* Thorax 2005; 60: 27-31.
- 30.** Carraro S, Folesani G, Corradi M, et al. *Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children.* Allergy 2005; 60: 476-481.
- 31.** Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, et al. *Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis.* Thorax 2005; 60: 22-26.
- 32.** Tate S, MacGregor G, Davis M, et al. *Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate.* Thorax 2002; 57: 926-929.
- 33.** Effros RM, Casaburi R, Su J, et al. *The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH.* Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 386-392.
- 34.** Hunt J, Yu Y, Burns J, et al. *Identification of acid reflux cough using serial assays of exhaled breath condensate pH.* Cough 2006; 2: 3.
- 35.** Formanek W, Inci D, Lauener RP, et al. *Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease.* Eur Respir J 2002; 19: 487-491.
- 36.** Inci D, Altintas DU, Kendirli SG, et al. *The effect of specific immunotherapy on exhaled breath condensate nitrite levels.* Allergy 2006; 61: 899-900.
- 37.** Nguyen TA, Woo-Park J, Hess M, et al. *Assaying all of the nitrogen oxides in breath modifies the interpretation of exhaled nitric oxide.* Vascul Pharmacol 2005; 43: 379-384.
- 38.** Baraldi E, Giordano G, Pasquale MF, et al. *3-Nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress, is increased in breath condensate of allergic asthmatic children.* Allergy 2006; 61: 90-96.
- 39.** Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. *Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma.* Respir Res 2005; 6: 79.
- 40.** Zihlif N, Paraskakis E, Tripoli C, et al. *Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate.* Pediatr Pulmonol 2006; 41: 509-514.
- 41.** Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattone G, et al. *Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis.* Thorax 2000; 55: 205-209.
- 42.** Corradi M, Folesani G, Andreoli R, et al. *Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation.* Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 395-399.
- 43.** Robroeks CM, Jobsis Q, Damoiseaux JG, et al. *Cytokines in exhaled breath condensate of children with asthma and cystic fibrosis.* Ann Allergy Asthma Immunol 2006; 96: 349-355.
- 44.** Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, et al. *Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections.* Pediatr Pulmonol 2005; 40: 494-499.
- 45.** Effros RM, Biller J, Foss B, et al. *A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates.* Am J Respir Crit Care Med 2003; 168: 1500-1505.
- 46.** Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al. *ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions.* Eur Respir J 2005; 26: 523-548.

Elisa Milanesi, Roberta Pigozzi, Giorgio Piacentini

Clinica Pediatrica, Università di Verona

La metodica dell'espettorato indotto

The method of induced sputum

Parole chiave: infiammazione, espettorato indotto, vie aeree, asma

Key words: inflammation, induced sputum, airways, asthma

Riassunto. Tra le varie tecniche per la valutazione del livello di infiammazione delle vie aeree, particolarmente importanti nei pazienti con asma bronchiale, l'espettorato indotto presenta il vantaggio di poter raccogliere sia cellule che mediatori solubili dalle vie aeree stesse. In tal modo è possibile ottenere informazioni più complete ed articolate rispetto ad un singolo parametro, come può essere il livello di ossido nitrico esalato, senza comunque esporre il bambino ai rischi di indagini più invasive quali una broncoscopia.

La metodica è relativamente semplice, sicura e ben accettata già dai bambini in età scolare.

Sui campioni ottenuti si possono eseguire osservazioni di citologia, immunocitologia e dosaggio di mediatori solubili.

I principali limiti, oltre all'imprescindibile collaborazione da parte del paziente, sono rappresentati dal tempo necessario alla raccolta e alla processazione del campione, dalla necessità di poter disporre di personale adeguatamente preparato e di un laboratorio adeguatamente attrezzato, nonché dall'impossibilità di dare una risposta immediata al paziente.

Per questi motivi, attualmente l'induzione dell'espettorato indotto, pur fornendo notevoli informazioni relative alle flogosi delle vie aeree, rappresenta ancora uno strumento soprattutto finalizzato a scopi di ricerca.

Accettato per la pubblicazione il 6 dicembre 2006.

Corrispondenza: Prof. Giorgio Piacentini, Clinica Pediatrica, Università di Verona, Policlinico "G. B. Rossi", Ple L. A. Scuro, 37134 Verona; e-mail: giorgio.piacentini@univr.it

Introduzione

Nonostante l'asma sia una patologia infiammatoria delle vie aeree e il trattamento di fondo, a partire dalle forme persistenti lievi, sia basato sull'impiego di steroidi inalatori (1), il monitoraggio dell'andamento clinico e la valutazione della risposta alla terapia sono riferiti essenzialmente ai sintomi riportati dal paziente e alla funzionalità respiratoria misurata con la spirometria, parametri che sono mal correlabili con lo stato di infiammazione delle vie aeree (2). Non sempre, inoltre, la funzionalità respiratoria risulta francamente alterata, persino nelle situazioni severe (3, 4), e non sempre essa correla con il grado di infiammazione eosinofila delle vie aeree, che è il principale fattore di determinazione del livello di flogosi e di predizione delle riasacerbazioni (5).

In studi selezionati, fino all'80% dei soggetti non in terapia cortisonica (5-7) e più del 50% dei soggetti sintomatici in terapia (8) presenta una

conta eosinofila nell'espettorato alterata, perciò il monitoraggio di tale parametro è ritenuto un utile strumento per monitorare e trattare al meglio la patologia (9, 10). Infatti, recenti indagini sperimentali suggeriscono che una strategia terapeutica diretta a normalizzare il livello di infiltrazione eosinofila delle vie aeree riduce il numero delle riasacerbazioni e degli accessi in ospedale (5).

È quindi evidente la necessità di poter disporre di tecniche non invasive di monitoraggio della flogosi proprio per poter gestire adeguatamente il profilo terapeutico e poterlo personalizzare sulle base delle effettive necessità del paziente. L'espettorato indotto, tra le metodiche non invasive di monitoraggio della flogosi delle vie aeree attualmente disponibili, presenta il vantaggio di consentire il recupero diretto di cellule e mediatori dalle vie aeree.

Metodica di raccolta e analisi dell'espettorato

La metodica di induzione dell'espettorato in età pediatrica si è evoluta a partire dall'inizio degli anni '90 da uno studio di Isabelle Pin, che per prima la ha applicata nel bambino (11).

I lavori disponibili relativi all'età pediatrica indicano che l'induzione dello sputo può essere attuata con successo dopo i 6 anni di età in percentuale variabile tra il 68 e il 100% (12), variabilità che potrebbe dipendere dall'utilizzo di metodiche differenti. Il meccanismo preciso con cui l'inalazione di salina ipertonica determina la produzione di espettorato non è noto. Possibili meccanismi sono una riduzione della viscosità muco tracheobronchiale, un incremento della clearance mucociliare e/o un incremento della produzione di muco (13). L'inalazione di soluzione salina ipertonica causa broncostruzione e tosse indotte dalla degranulazione mastocitaria e dalla stimolazione di fibre afferenti delle vie aeree (13-15), fattori anch'essi in grado di incrementare la produzione di muco.

Nonostante tutti i protocolli impiegati in età pediatrica prevedano l'inalazione di soluzioni saline ipertoniche erogate con nebulizzatore ultrasonico (Figura 1), alcuni gruppi hanno impiegato concentrazioni crescenti di NaCl, solitamente 3, 4 e 5%, mentre altri hanno descritto metodiche con l'inalazione di soluzione salina alla concentrazione fissa del 4,5%. Anche il tempo di erogazione non è costante per tutti gli autori, e tuttavia nella maggioranza

dei casi è stato compreso tra i 15 e i 20 minuti. Recentemente si è convenuto che proprio un tempo di 15-20 minuti è accettabile per gli scopi più comuni di applicazione della tecnica (16).

Da un punto di vista pratico, l'induzione dell'espettorato inizia dopo aver ottenuto un valore di funzionalità respiratoria di base (FEV_1) verso il quale riferire l'andamento dell'eventuale broncostruzione che si dovesse verificare durante l'inalazione di soluzione salina ipertonica. Nella maggior parte dei casi, a meno che non si voglia combinare all'induzione dell'espettorato la misurazione dei livelli di reattività bronchiale, come verrà descritto di seguito, il paziente viene trattato con salbutamolo, 200-400 mcg per via inalatoria prima di iniziare la nebulizzazione. Quest'ultimo trattamento, oltre a prevenire il broncospasmo indotto dall'inalazione della soluzione salina, porta a una maggior probabilità di successo della metodica nel bambino (17). Successivamente, la nebulizzazione di soluzione salina ipertonica viene effettuata per periodi di 5-10 minuti, intervallati da misure del FEV_1 , per un monitoraggio di sicurezza, e dalle manovre di espettorazione eseguite dal paziente, fino al suddetto tempo totale di 15-20 minuti. Prima di iniziare la procedura, al paziente viene chiesto di detergere la bocca con acqua per eliminare eventuali residui alimentari e per ridurre al minimo la contaminazione del campione da parte di cellule squamose. Una volta ottenuto l'espettorato, raccolto in un capsula di Petri (Figura 2), inizia la procedura di



Figura 1 Nebulizzatore ultrasonico per l'induzione dell'espettorato.

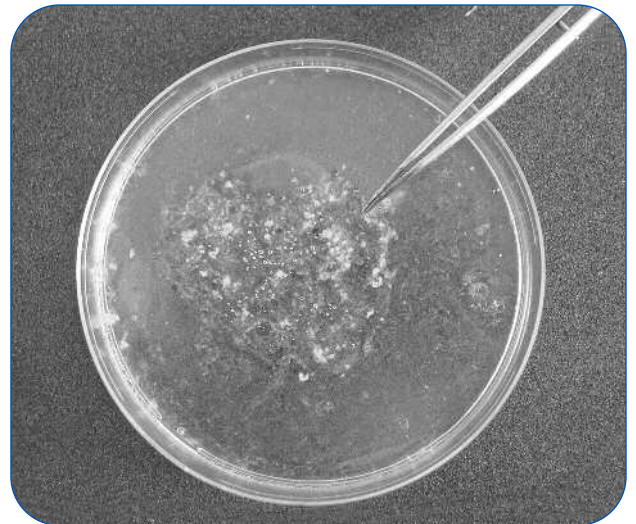


Figura 2 Campione di espettorato raccolto in capsula di Petri. I frustoli di mucosa vengono sperati dal resto del campione mediante selezione visiva e raccolti con pinzetta.

lavorazione, mediante la quale è possibile ottenere sia preparati citologici per la conta differenziale della componente cellulare (*Figura 3*) e per eventuali allestimenti di immunocitochimica (18), sia campioni sui quali effettuare la determinazione di mediatori solubili (19).

Relativamente alla processazione dell'espettorato sono descritti sostanzialmente due metodi: l'analisi di aggregati contenuti nello sputo o l'analisi *in toto* dello stesso. La prima metodica richiede la selezione visiva, il recupero selettivo e l'analisi degli aggregati cellulari (frustoli) isolati dallo sputo (10, 20, 21), la seconda prevede la processazione e l'analisi dell'intero sputo inclusa la saliva (22). Sicuramente la prima delle due tecniche è stata oggetto di un maggior approfondimento metodologico ed è stata impiegata in un maggior numero di studi in età pediatrica. I vantaggi principali della selezione dei frustoli dal campione consistono in una minor contaminazione da parte di cellule salivari, nella possibilità di esprimere la componente cellulare in relazione alla quantità di campione raccolto dalle vie aeree inferiori e di dosare eventuali mediatori riducendo l'effetto della contaminazione salivare (18). La metodica della lavorazione dell'intero campione presenta invece il vantaggio di una maggior rapidità di processazione, ma risente di una maggiore contaminazione da parte di cellule salivari, che può raggiungere anche il 20% (23). A prescindere dalla metodica scelta, non è consentito alternare l'impiego dell'una e dell'altra se i risultati del test devono essere comparati tra loro in diversi momenti o in diversi pazienti (18). L'induzione dello sputo nei bambini più piccoli è limitata dalla ridotta capacità di eseguire correttamente

la spirometria e dal basso volume corrente. Questo fattore limita la dose di soluzione salina che raggiunge le vie aeree (24).

Possibili effetti collaterali sono tosse, broncospasmo, vomito e stato di agitazione (25-27), ma la procedura è normalmente ben tollerata anche dai bambini con asma grave o con riesacerbazione in atto (28). La metodica di induzione dell'espettorato mediante inalazione di soluzione salina ipertonica può essere impiegata anche per definire contemporaneamente il grado di ipereattività e il grado di infiammazione delle vie aeree (29, 30). Studi eseguiti in pazienti adulti hanno dimostrato che il test di provocazione bronchiale con soluzione salina ipertonica è sensibile, ripetibile e mostra una correlazione migliore con i marcatori sierici dell'infiammazione rispetto a quello con metacolina (31). La metodica della tecnica combinata è relativamente semplice ed è stata impiegata anche in studi pediatrici (32, 33). Prima della raccolta, il paziente è sottoposto ad accurata anamnesi finalizzata ad escludere infezioni in atto e a visita medica con misurazione della temperatura corporea. Nel caso della tecnica combinata con la misurazione della reattività bronchiale, il paziente viene sempre sottoposto a inalazione di soluzione salina ipertonica a dosaggio noto e costante attraverso un boccaglio connesso ad un apparecchio per aerosolterapia ad ultrasuoni impostato sull'erogazione massimale (*Figura 1*). Prima di iniziare a somministrare la soluzione salina per via inalatoria viene eseguita una spirometria con la tecnica tradizionale e determinato un valore basale di FEV₁. Stabilita la funzionalità respiratoria basale, il bambino inala soluzione salina ipertonica per un primo periodo di 30 secondi e ripete la spirometria 1 minuto dopo il termine dell'inalazione. Qualora non si ottenga alcun espettorato e la funzionalità respiratoria resti superiore all'80% del valore basale, il test procede. Il bambino prosegue l'inalazione per periodi di 1, 2, 4 e 8 minuti ciascuno. Al termine di ogni periodo, il bambino viene incoraggiato ad espettorare e viene misurata la funzionalità respiratoria. Anche in questo caso, il campione di espettorato viene raccolto in una capsula di Petri, mantenuto a 4°C e processato entro 2 ore. Viene inoltre normalmente compilato un diario di eventuali effetti collaterali manifestati dal bambino durante il test. La somministrazione di soluzione salina ipertonica viene comunque interrotta quando la funzione respiratoria cade sotto l'80% del

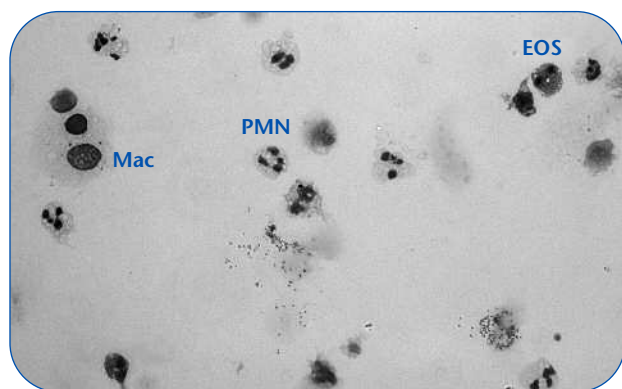


Figura 3 Esempio di preparato risultante dalla processazione del campione. Mac, macrofagi; EOS, eosinofili; PMN, neutrofilii.

valore basale, quando il bambino manifesta sintomi respiratori o quando si rifiuta di proseguire. Qualora la funzione respiratoria mostri un decremento pari o superiore al 20% viene somministrato salbutamolo e viene verificato il successivo miglioramento clinico. Il bambino è rinvio a domicilio solo quando il FEV₁ raggiunge nuovamente il valore basale. La procedura viene comunque sospesa anche nel caso non si sia ottenuta alcuna efficace produzione di espettorato dopo 20 minuti di inalazione, nonostante il FEV₁ si mantenga stabile (32).

Applicazioni cliniche della metodica dell'espettorato indotto

La principale applicazione clinica dello sputo indotto consiste nella possibilità di studiare in modo non invasivo l'infiammazione bronchiale, come "surrogato" della broncoscopia con biopsia bronchiale, il cui impiego è limitato da ragioni etiche e di sicurezza (10, 22, 34-36).

Alcuni studi condotti negli adulti per confrontare i risultati forniti dall'analisi rispettivamente del broncolavaggio, delle biopsie bronchiali e dell'espettorato dimostrano come vi sia una buona correlazione nel tipo di cellule raccolte con le diverse metodiche. La percentuale di eosinofili nell'espettorato correla in modo significativo con la percentuale ottenuta nelle biopsie bronchiali (R_s 0,52, $p=0,03$) e nel broncolavaggio (R_s 0,55, $p=0,02$) (37-39).

L'analisi dello sputo indotto in età pediatrica rappresenta al momento attuale soprattutto una metodica a scopo di ricerca (26, 40) anche se, recentemente, sono comparsi studi che ne suggeriscono un impiego clinico finalizzato alla gestione della componente infiammatoria della patologia (33).

È proprio la necessità di disporre di un "inflammometro" per monitorare l'andamento della flogosi delle vie aeree nel bambino con asma e per una più precisa gestione terapeutica che apre prospettive interessanti all'impiego di questa tecnica anche nella pratica clinica.

Infatti, l'utilizzo di questa metodica potrebbe fornire informazioni importanti sulla fisiopatologia dell'asma e sui fattori che ne determinano la gravità. Tra i vari tipi cellulari presenti nello sputo, gli eosinofili rappresentano il principale marcatore di infiammazione nell'asma bronchiale (12, 34), patologia nella cui patogenesi questo tipo cellulare riveste un ruolo di assoluto rilievo (39).

I livelli di eosinofili (11, 41-44) e la concentrazione di proteina cationica eosinofila (ECP) (43-45) sono più alti nell'espettorato degli asmatici rispetto ai soggetti sani e non si normalizzano completamente con l'uso di steroidi inalatori (43).

Al contrario è stato dimostrato che in bambini con iperreattività bronchiale dimostrata al test con metacolina, ma asintomatici, si possono riscontrare livelli normali di eosinofili nello sputo (46). Questi studi dimostrano quindi che gli eosinofili e i loro prodotti descrivono il quadro caratteristico dell'infiammazione delle vie aeree nell'asma bronchiale nel bambino e che la metodica dello sputo indotto rappresenta un valido strumento per il monitoraggio di questa componente di malattia.

Cai et al. (42) hanno stabilito che il valore che distingue i soggetti sani dagli asmatici nella conta eosinofila dello sputo indotto si colloca al 2,5%. Gli autori dimostrano che gli eosinofili nei bambini sani si sono attestati su una mediana del 0,3%, mentre nei soggetti con asma sono risultati significativamente più alti (mediana 4,3%, $p=0,0005$). Anche i bambini con asma ben controllato, così come i sintomatici, hanno comunque più eosinofili e più cellule nello sputo rispetto ai soggetti sani (42).

Negli asmatici, la conta degli eosinofili nello sputo cambia sostanzialmente in risposta a differenti dosi e durata della terapia con cortisonici per via orale o inalatoria e l'incremento del numero degli eosinofili è considerato un fattore predittivo le riasacerbazioni (5). Una terapia mirata alla normalizzazione degli eosinofili nello sputo potrebbe ridurre il numero di riasacerbazioni e migliorare il controllo della malattia (5).

Analogamente, è stato dimostrato che la conta degli eosinofili in campioni di espettorato indotto può contribuire ad una migliore gestione della sospensione della terapia steroidea nei pazienti asmatici (9).

L'analisi dello sputo indotto permette, oltre alla conta degli eosinofili, anche lo studio dei mediatori dell'infiammazione, compresi proteine e citochine che sono presenti nella fase fluida del campione.

I granuli degli eosinofili attivati rilasciano proteine, e tra queste l'ECP, il cui livello nella fase fluida dello sputo correla con il grado di degranolazione eosinofila. Nell'asma ben controllato i livelli di ECP sono aumentati di due-tre volte rispetto alla norma. Livelli molto alti ($>1,000$ mcg/L) sono riportati in caso di bambini con attacco acuto grave (47) suggerendo che ci sia un'intensa

degranulazione nelle esacerbazioni acute. I cortisonici inalatori riducono i livelli di ECP nell'espettorato e tale variazione è associata con una riduzione dei sintomi (45).

In un recente studio Tryuen et al. dimostrano come il dosaggio di IL-5 ($p=0,001$) e IL-13 ($p=0,03$) sia più elevato negli asmatici rispetto ai controlli sani (48). Negli asmatici sono inoltre dosabili IL-4 e INF-gamma e l'espressione di IL-4, IL-5 e IL-13 ben correlano in questi soggetti con la conta degli eosinofili (48). In particolare i livelli di IL-5 riflettono il grado di infiltrazione eosinofila altrettanto bene quanto la misura dell'NO esalato e la valutazione dell'ipereattività bronchiale (48).

L'applicazione nella pratica clinica dei risultati ottenuti dagli studi sperimentali, con determinazione del grado di infiammazione bronchiale e impostazione della terapia in relazione alle informazioni desunte dall'analisi dell'espettorato indotto, potrebbe permettere di non esporre inutilmente il bambino ad alte dosi di steroidi inalatori e ai conseguenti effetti collaterali.

Espettorato indotto e fibrosi cistica

La metodica dell'espettorato indotto potrebbe trovare una sua applicazione anche nei pazienti con fibrosi cistica (FC), sempre al fine di stimare il grado di infiammazione delle vie aeree e ottenere, così, un utile strumento di monitoraggio della malattia.

Sagel et al. hanno dimostrato in uno studio caso-controllo coinvolgente bambini con FC, confrontati con bambini sani, valori significativamente più elevati rispetto alla cellularità totale dello sputo, alla conta dei neutrofili, ai livelli di IL-8 nonché dell'attività dell'elastasi neutrofila. Tali valori correlano in senso inverso con il FEV₁. Questi studi dimostrano anche come i campioni di espettorato indotto forniscano, nei pazienti FC, informazioni sovrapponibili a quelle ottenute dall'analisi di campioni di espettorato spontaneo (49, 50).

Un lavoro di Ho et al. su 43 bambini con FC (età media 7,2 anni) dimostra come l'esame colturale dell'espettorato indotto permetta di ottenere informazioni microbiologiche aggiuntive utili nella gestione della malattia (51).

Aspetti pratici legati all'utilizzo clinico dello sputo indotto

Il problema principale legato all'utilizzo dello sputo indotto nella pratica clinica consiste soprattutto nel tempo necessario all'esecuzione delle fasi di ottenimento del campione e di processazione dello stesso da parte di personale adeguatamente preparato. Queste fasi rendono l'intera procedura piuttosto onerosa per un impiego clinico di routine, anche in considerazione della necessità di processare il campione entro due ore dalla raccolta, e quindi di coordinare le attività del personale clinico e di quello di laboratorio. Inoltre non è possibile fornire al paziente una risposta immediata.

D'altro canto, la metodica dello sputo indotto, se condotta in centri adeguatamente attrezzati e da personale esperto, può fornire un numero maggiore di informazioni sullo stato di infiammazione delle vie aeree rispetto ad altre tecniche di più pratica ed immediata esecuzione, come la misurazione dell'ossido nitrico esalato.

Inoltre non presenta nessuno dei problemi di sicurezza e di accettabilità da parte del bambino o dei genitori che normalmente si pongono per metodiche più invasive, quali broncoscopia con raccolta di biopsie o lavaggio broncoalveolare.

Conclusioni

Attualmente l'analisi dell'espettorato indotto è considerata soprattutto uno strumento finalizzato alla ricerca, sebbene gli studi relativi stiano rapidamente dimostrando la sua effettiva utilità nella gestione clinica dell'asma.

Bibliografia

1. British Thoracic Society; Scottish Intercollegiate Guidelines Network. *British guidelines of management of asthma*. Thorax 2003; 58 (suppl 1): i1-94.
2. Gibson P. *Monitoring the patient with asthma: an evidence based approach*. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 17-26.
3. Enright PL, Lebowitz MD, Cockcroft DW. *Physiologic measures: pulmonary function tests. Asthma outcome*. Am J Resp Crit Care Med 1994; 149: S9-20.
4. Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, et al. *A comparison of the validity of different diagnostic tests in adult with asthma*. Chest 2002; 121: 1051-1057.
5. Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. *Asthma exacerbation and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial*. Lancet 2002; 360: 1715-1721.
6. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. *Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements*. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 308-317.
7. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, et al. *The relationships among hydrogen peroxide in empire breath condensate, airway inflammation, and asthma severity*. Chest 2002; 121: 338-346.
8. Pavord ID, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Hargreave FE. *The use of induced sputum to investigate airway inflammation*. Thorax 1997; 52: 498-501.
9. Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, et al.; Asthma Clinical Research Network, National Heart, Lung, and Blood Institute/NIH. *Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol 2005; 115: 720-727.
10. Zacharasiewicz A, Erin EM, Bush A. *Noninvasive monitoring of airway inflammation and steroid reduction in children with asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2006; 6: 155-160.
11. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. *Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma*. Thorax 1992; 47: 25-29.
12. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. *Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate*. Eur Respir J 2000; 16: 1008-1015.
13. Umeno E, McDonald DM, Nadel JA. *Hypertonic saline increases vascular permeability in the rat trachea by producing neurogenic inflammation*. J Clin Invest 1990; 85: 1905-1908.
14. Finney MJ, Anderson SD, Black JL. *Terfenadine modifies airway narrowing induced by the inhalation of nonisotonic aerosols in subjects with asthma*. Am Rev Respir Dis 1990; 141: 1151-1157.
15. Eschenbacher WL, Boushey HA, Sheppard D. *Alteration in osmolarity of inhaled aerosols cause bronchoconstriction and cough, but absence of a permanent anion causes cough alone*. Am Rev Respir Dis 1984; 129: 211-215.
16. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. *Report of working group 1: sputum induction*. Eur Respir J 2002; 20 (Suppl 37): 3S-8S.
17. Jones PD, Hankin R, Simpson J, et al. *The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children*. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 1146-1149.
18. Efthimiadis A, Spanevello A. *Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation*. Eur Respir J 2002; 20 (Suppl. 37): 19s-23s.
19. Kelly MM. *Analysis of fluid-phase mediators*. Eur Respir J 2002; 20 (Suppl. 37): 24s-39s.
20. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. *Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination*. Eur Respir J 1996; 9: 1174-1180.
21. Popov TA, Pizzichini MMM, Pizzichini E, et al. *Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis*. Eur Respir J 1995; 8: 559-565.
22. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. *Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects*. Am Rev Respir Dis 1993; 147: 1126-1131.

- 23.** Efthimiadis A, Pizzichini MMM, Kolendowicz R, et al. *The influence of cell viability and squamous epithelial cell contamination on the reliability of sputum differential cell counts.* Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: A384.
- 24.** Riedler J, Robertson CF. *Effect of tidal volume on the output and particle size distribution of hypertonic saline from an ultrasonic nebulizer.* Eur Respir J 1994; 7: 998-1002.
- 25.** Pizzichini E, Pizzichini MMM, Leigh R, et al. *Safety of sputum induction.* Eur Respir J Suppl 2002; 37: 9S-18S.
- 26.** Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, et al. *Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 575-582.
- 27.** Ryttilä P, Pelkonen AS, Metso T, et al. *Induced sputum in children with newly diagnosed mild asthma: the effect of 6 months of treatment with budesonide or disodium cromoglycate.* Allergy 2004; 59: 839-844.
- 28.** Twaddell SH, Gibson PG, Carty K, et al. *Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum.* Eur Respir J 1996; 9: 2104-2108.
- 29.** Riedler J, Read T, Salton M, et al. *Hypertonic saline challenge in an epidemiologic survey of asthma in children.* Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 1632-1639.
- 30.** de Meer G, Marks GB, de Jongste JC, Brunekreef B. *Airway responsiveness to hypertonic saline: dose-response slope or PD₁₅?* Eur Respir J 2005; 25: 153-158.
- 31.** Sont JK, Booms P, Bel EH, et al. *The determinants of airway hyperresponsiveness to hypertonic saline in atopic asthma in vivo. Relationship with subpopulations of peripheral blood leucocytes.* Clin Exp Allergy 1993; 23: 678-688.
- 32.** Li A, Tsang TW, Chan DF, et al. *Induced sputum in childhood asthma.* Hong Kong Med J 2005; 11: 289-294.
- 33.** Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, et al. *Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children.* Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 1077-1082.
- 34.** Gibson PG. *Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol 1998; 102: S100-101.
- 35.** Gibson PG, Saltos N, Borgas T. *Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid-treated asthma.* J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 752-759.
- 36.** Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, et al. *Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma.* Thorax 2003; 58: 116-121.
- 37.** Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, et al. *Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies.* Clin Exp Allergy 1997; 27: 769-779.
- 38.** Pizzichini E, Pizzichini MMM, Kidney JC, et al. *Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared.* Eur Respir J 1998; 11: 828-834.
- 39.** Frigas E, Gleich GJ. *The eosinophil and the pathophysiology of asthma.* J Allergy Clin Immunol 1986; 77: 527-532.
- 40.** Gibson PG. *Sputum induction in children.* Eur Respir J 2002; 20: 44S-46S.
- 41.** Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, et al. *Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood.* Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 36-41.
- 42.** Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. *Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children.* Eur Respir J 1998; 11: 848-853.
- 43.** Mattes J, Storm van's Gravesande K, Reining U, et al. *NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma.* Eur Respir J 1999; 13: 1391-1395.
- 44.** Oh JW, Lee HB, Kim CR, et al. *Analysis of induced sputum to examine the effects of inhaled corticosteroid on airway inflammation in children with asthma.* Ann Allergy Asthma Immunol 1999; 82: 491-496.

- 45.** Sorva R, Metso T, Turpeinen M, et al. *Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children.* *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8: 45-50.
- 46.** Pin I, Radford S, Kolendowicz R, et al. *Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine hyperresponsiveness.* *Eur Respir J* 1993; 6: 1249-1256.
- 47.** Norzila M, Fakes K, Henry RL, et al. *IL-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma.* *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 769-774.
- 48.** Truyen E, Coteur L, Dilissen E, et al. *Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurements in sputum of asthma patients.* *Thorax* 2006; 61: 202-208.
- 49.** Sagel SD, Kapsner R, Osberg I, et al. *Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction.* *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1425-1431.
- 50.** Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, et al. *Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis.* *J Pediatr* 2002; 141: 811-817.
- 51.** Ho SA, Ball R, Morrison LJ, et al. *Clinical value of obtaining sputum and cough swab samples following inhaled hypertonic saline in children with cystic fibrosis.* *Pediatr Pulmunol* 2004; 38: 82-87.

Stefania La Grutta

U.O.S. Allergologia e Pneumologia Pediatrica, ARNAS Civico-Palermo; ST VIII Ambiente e Salute, ARPA Sicilia

Ruolo dei biomarker nel sangue periferico nella valutazione dell'infiammazione e del controllo dell'asma nel bambino

Role of peripheral blood biomarkers related to airway inflammation and monitoring of childhood asthma

Parole chiave: infiammazione vie aeree, asma atopico, sangue periferico, cellule T, citochine, marker, correlazioni, ossido nitrico esalato, inquinamento

Key words: *airway inflammation, atopic asthma, peripheral blood, Tcell, cytokine, marker, correlation, exhaled nitric oxide, pollution*

Riassunto. Il numero degli eosinofili periferici correla con la severità dell'asma. La sECP e la sEPX sono rappresentative dell'atopia, efficienti nel riflettere la componente eosinofila dell'infiammazione allergica e scarsi indicatori di asma. La bassa sensibilità e specificità di sECP, sEPX, sEPO inficia la validità nella diagnosi e prognosi dell'asma cronico. La conta degli eosinofili periferici la sECP si riducono dopo il trattamento con differenti farmaci antinfiammatori. Forte correlazione tra le citochine di tipo TH2 (IL-4) ed i marker dell'infiammazione delle vie aeree, così come una diversa espressione dei marker di attivazione dei subset linfocitari. La variabilità di espressione di alcuni marcatori periferici correla alla persistente infiammazione delle vie aeree nel bambino con asma moderato, suggerendo l'esistenza di una variabilità clinica. sICAM-1, sVCAM-1 e sE-selectin e TARC rappresentano promettenti marcatori nei bambini della severità. Utile valutare gli effetti infiammatori sistemici da esposizione ad inquinanti. Il ruolo dei marcatori dell'infiammazione bronchiale nel sangue periferico nella diagnosi precoce e prognosi necessita di ulteriore approfondimento in riferimento soprattutto al loro specifico valore rispetto ai dati clinici.

Accettato per la pubblicazione il 6 dicembre 2006.

Corrispondenza: Dott.ssa Stefania La Grutta, U.O.S. Allergologia e Pneumologia Pediatrica, ARNAS Civico-Palermo, Via Benedettine 1, 90100 Palermo, St.VIII Ambiente e Salute, ARPA Sicilia; e-mail: slagrutta@arpa.sicilia.it

Abbreviazioni: EGP, Eosinophil Granule Protein; MBP, Major Basic Protein; ECP, Eosinophil Cationic Protein; EPX, Eosinophil Protein X; EPO, Eosinophil Peroxidase; eNO, exhaled Nitric Oxide; PEF, Picco di Flusso Espiratorio; FEV₁, Capacità Vitale Forzata al 1°; FEF₅₀, Flusso espiratorio forzato al 50% della Capacità Vitale Forzata; FEF_{25-75%}, Flusso espiratorio forzato tra il 25 e 75% della Capacità Vitale Forzata; FEV₁/FEVC, Indice di Tiffenau; BHR, Bronchial Hyperreactivity

Introduzione

In riferimento alle forti evidenze scientifiche che supportano il ruolo chiave dell'infiammazione delle vie aeree nella fisiopatologia dell'asma (1), il monitoraggio e la gestione della malattia dovrebbero opportunamente includere la determinazione dei mediatori dell'infiammazione delle vie aeree, in aggiunta alle misure biologico-funzionali di disfunzione polmonare (2). I marker dell'asma nel sangue

periferico, costituiscono un gruppo di mediatori che insieme ai mediatori non invasivi (ad es. ossido nitrico nell'aria esalata), partecipano alla valutazione e monitoraggio dei differenti aspetti fisiopatologici e terapeutici dell'asma. Eosinofili, T linfociti, mastociti, macrofagi, neutrofili, cellule epiteliali e cellule strutturali, mediatori e proteine proinfiammatorie, implicati nella patogenesi dell'asma, potrebbero costituire

i marcatori per il monitoraggio dell'infiammazione bronchiale. Inoltre, le citochine prodotte dalle cellule residenti o infiltranti, sono responsabili dell'avvio e del mantenimento dei processi infiammatori. La sede e la distribuzione dei processi di infiammazione nelle vie aeree dei pazienti asmatici interessa le grandi e le piccole vie aeree, ed in particolare l'infiammazione polmonare distale contribuisce significativamente alla fisiopatologia della malattia (3). Poiché l'intensità dell'infiammazione può essere correlata con la severità di malattia, è molto importante poter disporre di marker in grado di misurare l'intensità della flogosi. Inoltre, alcuni specifici marcatori possono supportare i processi diagnostici in aggiunta all'accurato monitoraggio della condizione clinico-funzionale, consentendo la possibilità di una valutazione prognostica. Infine, l'utilizzo dei marker dell'infiammazione bronchiale permette di evidenziare precocemente gli effetti del controllo terapeutico, contribuendo efficacemente alla comprensione degli aspetti di progressione e di storia naturale della malattia (Tabella 1).

Lo scopo di questa review è quello di illustrare il ruolo dei biomarker nel sangue periferico nella valutazione dell'infiammazione e del controllo dell'asma nel bambino, con particolare dettaglio per gli eosinofili, le Eosinophil Granule Protein (EGP) ed i profili delle citochine.

Marcatori di infiammazione eosinofila

Sebbene l'infiammazione nella patogenesi dell'asma sia associata ai prodotti di attivazione dei linfociti T e degli eosinofili, l'infiammazione eosinofila caratterizzata dall'afflusso e attivazione di eosinofili, rappresenta il carattere distintivo dell'asma

Tabella 1 Marker dell'infiammazione bronchiale nel sangue periferico.

- Eosinofili, sECP/eosinofili
- EGP: sECP, sEPX, sEPO
- Citochine: IL-2, sIL-2R, IL-5, IL-8, IL-10
- CD4+CD25 HLA-DR ; CD4+CD45RO+, CD34+
- sCD14, GM-CSF, sTNF-alfa
- sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin
- MDC, TARC
- sUTI
- sNO

bronchiale. Le EGP sono depositate all'interno di specifici granuli dentro le cellule eosinofile, ed in particolare l'ECP, l'EPX, l'EPO dentro la matrice e l'MBP in strutture cristalline. L'ECP e l'EPX sono anche definite neurotossine di derivazione eosinofila, in rapporto agli effetti di neurotossicità specifica (4). La maggior parte delle EGP (ECP, EPX, EPO) è di specifica produzione degli eosinofili, mentre la MBP può essere in parte prodotta dai basofili (5), pertanto soltanto le prime tre EGP sono considerate strettamente specifiche nella misura di attivazione eosinofila in corso di infiammazione delle vie aeree. I livelli di sECP ed sEPX misurabili nel sangue dipendono, sia dalla quota rilasciata spontaneamente dagli eosinofili, sia da alcuni fattori come la temperatura di incubazione o il tempo prima della centrifuga, o anche il tipo di container utilizzato per la conservazione del sangue (6). Le EGP sono state particolarmente studiate, come marker dell'infiammazione bronchiale ed anche come espressione della partecipazione degli eosinofili alla patogenesi dell'asma. Pertanto, in analogia al numero degli eosinofili periferici, sono possibili fattori predittivi di esacerbazioni e utilizzate spesso come marcatori di infiammazione in ambito di ricerca e in studi clinici controllati. Infatti, nel sangue periferico, la conta degli eosinofili periferici o i livelli di enzimi di derivazione eosinofila presentano una riduzione dopo il trattamento con differenti farmaci antinfiammatori.

Eosinofili

Gli eosinofili periferici giocano un ruolo centrale nei processi infiammatori dell'asma. Studi recenti hanno suggerito che, sebbene l'eNO (exhaled Nitric Oxide) sia maggiormente informativo sullo stato di infiammazione delle vie aeree, esiste una significativa correlazione dei valori di eNO con il numero di eosinofili periferici ed il livello di IgE totali (7). In bambini asmatici sensibili all'acaro della polvere, il valore base degli eosinofili sembra essere correlato al verificarsi della reazione allergica tardiva, che consegue al test di provocazione bronchiale con allergene specifico (8). Inoltre, il marcato aumento dell'eosinofilia è fortemente correlato alla maggiore severità dell'asma del bambino (9), così come ad elevati livelli di altri marcatori di flogosi eosinofila quali la sECP (10, 11) e l'EPO (12). Infine, è segnalato che la riduzione degli eosinofili periferici, riscontrabile a seguito dell'esposizione allergica in bambini con asma

allergico sensibilizzati ad epiteli animali, sia da imputare al reclutamento degli stessi in sede polmonare durante le fasi precoci della flogosi (13).

ECP, EPX, EPO

L'ECP è la proteina più frequentemente utilizzata come marker dell'infiammazione eosinofila, anche se può essere in parte prodotta dai neutrofilii (14). La determinazione di ECP nel siero (sECP) è stata utilizzata come strumento di screening per patologia asmatica, definendone i valori di riferimento in soggetti sani (15), come possibile marker utile nelle correlazioni cliniche (11, 16-18), funzionali (19, 20) dei pazienti asmatici in differenti stadi di malattia (21, 22), come indice di controllo della flogosi allergica in corso di terapie antinfiammatorie (23-25), ed inoltre come fattore di prognosi dell'asma pediatrico (26, 27). Sebbene sia dimostrata una correlazione tra l'aumento di sECP e lo score dei sintomi in bambini asmatici sintomatici rispetto agli asintomatici (16, 18), tuttavia esiste un'ampia sovrapposizione di valori tra soggetti sintomatici e non. Occorre precisare, che elevati livelli di sECP sono reperibili in bambini molto piccoli esposti al fumo passivo materno e sono inversamente correlati con l'età (28). Inoltre, oscillazioni circadiane, con picchi notturni e nelle prime ore del mattino (29), e stagionali (30) possono influenzare i valori di sECP, condizionando la corretta valutazione del livello misurabile anche in soggetti sani. Pertanto, considerando la complessità dei meccanismi dell'infiammazione e l'eterogeneità dell'asma pediatrico, l'utilizzo di un solo marcatore potrebbe risultare troppo riduttivo. Più recentemente, in considerazione dell'insufficiente sensibilità e specificità della sECP, in rapporto ai diversi aspetti diagnostici e di correlazione con livelli di severità dell'asma in età pediatrica, ed al ridotto valore predittivo rispetto al riscontro della semplice familiarità per atopia, si suggerisce che alla determinazione di sECP, si associ la valutazione di altri mediatori (ad es. eNO), al fine di ottenere una maggiore e più dettagliata definizione dei processi infiammatori dell'asma (31). Alcuni Autori, hanno studiato il rapporto sECP/eosinofili periferici, come marker maggiormente utile nell'approccio clinico di *grading* di severità (32), ed indice correlabile alla media mensile del punteggio clinico (33), suggerendone l'uso nel monitoraggio della riattivazione eosinofila che segue alla riacutizzazione (34). Lo studio della correlazione tra sECP ed i parametri

obiettivi di funzionalità respiratoria (PEF, FEV₁, FEF₂₅₋₇₅, FEF₅₀, FEV₁/FVC) ed iperreattività bronchiale (BHR), ha fornito risultati non univoci. La maggior parte degli Autori, riferisce l'esistenza di una diversa intensità di correlazione, supportando l'ipotesi, che gli elevati livelli sECP, riflettano l'intensità dell'infiammazione eosinofila delle vie aeree e lo stadio di maggiore attività di malattia (10, 11, 21, 35).

La segnalazione che la quota misurabile di ECP intracellulare, pur correlando con il FEV₁, risulti comunque ridotta negli asmatici, fa supporre che durante l'attivazione eosinofila esista o un mascheramento degli epitopi o uno spostamento verso i progenitori di derivazione midollare che contengono un minor numero di granuli (36). Roquet et al. hanno valorizzato l'aspetto dell'espressione dell'epitopo EG2 sugli eosinofili periferici, calcolando che l'aggiunta di questo parametro alla valutazione dei livelli di sECP ed alla conta di eosinofili periferici, consente il raggiungimento di un elevato indice di predittività (100%) della BHR, in pazienti con sospetto di asma (37).

Nella corretta valutazione del valore e del significato di sECP, è necessario accertare la presenza di atopia, che può giustificare l'aumento ed il *time-course* del marker di infiammazione allergica, durante l'esposizione allergenica specifica (8, 38, 39).

Poiché dall'analisi delle innumerevoli segnalazioni in letteratura sul ruolo di sECP, emerge che ad oggi è ancora non perfettamente chiarito il reale contributo nell'approccio diagnostico, nel monitoraggio clinico della malattia e nella interazione con i dati funzionali, e la possibilità di utilizzo come valido strumento prognostico, è ancora necessario approfondire queste osservazioni, mediante l'avvio di studi longitudinali volti alla misura del differente peso dei fattori condizionanti la prognosi dell'asma nel bambino.

I risultati degli studi esistenti sulla valutazione di EPO, indicano che questo marcatore correla sia con sECP che con sEPX nella riacutizzazione clinica dell'asma (12), sia con il numero degli eosinofili nei differenti livelli di severità di malattia (40), ed inoltre in analogia ad sECP, sEPO presenta variazioni stagionali (30) ed una correlazione negativa con gli indici di funzionalità respiratoria (FEV₁, FEF₂₅₋₇₅, FEF₅₀) (11).

Lo studio di sEPX nell'asma pediatrico, ha confermato che questa EGP presenta un comportamento assai simile alla sECP. Infatti, entrambi i marcatori

mostrano variazioni circadiane da imputare alla variazione nella produzione di eosinofili, conseguente al ritmo di secrezione ormonale del cortisolo (41). Inoltre, sebbene esistano significative differenze di valori da soggetti atopici e non, la bassa sensibilità e specificità delle misurazioni, non consente di utilizzarli come validi strumenti diagnostici nel singolo soggetto (42). La *sECP* e la *sEPX* possono considerarsi maggiormente rappresentative della condizione di atopia, che non specificamente espressione della malattia infiammatoria asmatica in senso generale, mostrandosi più efficienti nel riflettere la componente eosinofila dell'infiammazione allergica e scarsi indicatori di asma cronico. In particolare, la relazione tra *sEPX* ed i parametri di funzionalità respiratoria e BHR è discordante, perché alcuni Autori evidenziano una debole correlazione negativa tra FEV_1 , FEF_{25-75} e BHR (35), altri ne sottolineano l'assoluta mancanza (43, 44).

Linfociti attivati e citochine

Lo studio del ruolo nella patogenesi dell'asma dei linfociti attivati e delle citochine prodotte durante le diverse fasi clinico-biologiche della malattia, è stato oggetto di numerose pubblicazioni, volte sia all'osservazione dei differenti pattern di espressione dello sbilanciamento immunologico implicato nei processi flogistici, sia alla maggiore definizione delle interazioni clinico-funzionali e terapeutiche. Molto recentemente Shirai et al. hanno sottolineato la forte correlazione tra le citochine di tipo TH2 (*IL-4*) ed i marker dell'infiammazione delle vie aeree (eNO, eosinofili nello sputo indotto), supportando ancor di più la centralità di questo aspetto nell'ampia valutazione del complesso sistema che caratterizza la flogosi allergica asmatica (45). Il profilo dei linfociti è stato studiato in rapporto alle diverse fasi di malattia, evidenziando un aumento di CD4 attivati con espressione di marker di attivazione (*CD25* e *HLA-DR*) nelle riacutizzazioni, e negli stadi di maggiore severità e compromissione funzionale (46-48).

Sono particolarmente interessanti le recenti segnalazioni riguardanti la *sIL-2R*, che contrariamente a precedenti risultati non favorevoli (49), mostra un livello che correla con il maggiore impegno clinico nei pazienti asmatici (50-52), proponendosi come utile indice di severità. Inoltre, la maggiore concentrazione media di *sIL-2R* negli

atopici con asma moderato persistente in fase di remissione, suggerisce una persistente attivazione e coinvolgimento dei linfociti T-CD4+ attivati nel mantenimento della flogosi (53).

Moma et al. hanno studiato i meccanismi di apoptosi dei linfociti di pazienti asmatici sensibili all'acaro della polvere, con l'obiettivo di chiarire il ruolo dei subset linfocitari coinvolti nella remissione dell'asma, dimostrando un caratteristico aumento della apoptosi spontanea prevalente nelle cellule CD8 (54), che contrasta con l'inefficacia dei meccanismi apoptotici delle stesse cellule nella fasi di attività della malattia. È stato inoltre osservato, che i linfociti CD8 sono maggiormente sequestrati, rispetto ai linfociti CD4, nelle vie aeree durante le crisi acute di asma (50).

È da segnalare negli asmatici la caratteristica presenza, indipendentemente dalla condizione clinica acuta o stabile, di elevata proporzione di memory T helper cells (*CD4+CD45RO+*), suggerendo che questa sottopopolazione sia specifica del fenotipo asma atopico (55).

Numerosi studi hanno sottolineato l'assenza di un ruolo chiave di *IL-5* (56), *IL-2* e *IL-10* (57) sia come indicatori di malattia asmatica attiva nella fase acuta che in associazione alla rinite (58).

Halasz et al. hanno recentemente evidenziato una correlazione significativa tra *TNF-alpha* e *sECP*, *IL-8* e BHR, rimarcando il ruolo preminente dell'*sTNF-alpha* nei meccanismi patogenetici della BHR (59). Alcuni Autori hanno valutato nei pazienti asmatici il ruolo delle cellule *CD34+* (mast cells colony forming cells), evidenziando che il riscontro dell'aumento della linea cellulare emopoietica differenziandosi in mastcellule, può contribuire al reclutamento di queste cellule nelle sedi della flogosi asmatica (60), e che esiste una positiva correlazione con altri biomarcatori periferici di attività infiammatoria (*IL-5*, *GM-CSF*) (61).

Durante le esacerbazioni di asma ed in particolare nella condizione di stato di male asmatico, è stato riscontrato un elevato livello di *sCD14*, recettore solubile per l'endotossina (LPS- Lipopolisaccaride) espresso prevalentemente su monociti e macrofagi (62). È possibile che tale aumento sia da imputare ad un'*upregulation* del CD14 sui monociti indotta dalla MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), che può condurre ad una maggiore adesione dei monociti all'endotelio vascolare e successiva migrazione transendoteliale nel tessuto delle vie aeree (63).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) e citochine

La valutazione negli asmatici delle interrelazioni tra i marker dell'infiammazione e la severità dell'asma è stata oggetto di alcuni studi, che hanno verificato il ruolo della *IL-8* e *GM-CSF* (*Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*), nel monitoraggio dell'attività dell'asma (64, 65). In particolare, sulla base dei differenti livelli di *GM-CSF*, *IL-8* ed eNO, è stato possibile identificare due sottogruppi di bambini con asma moderato (bassi e alti produttori) (Figura 1), laddove nel sottogruppo dei pazienti "high producers" sono evidenti le correlazioni cliniche sia con il maggior numero di esacerbazioni sia con il maggior declino della funzione polmonare espresso come minore FEV₁ post-broncodilatatore alla fine dello studio (Figura 2) (66). Questo risultato sottolinea che i marker presenti nel sangue periferico sono espressione della persistente infiammazione delle vie aeree nel bambino con asma moderato, e nonostante l'adeguata terapia steroidea inalatoria, esprimono una caratteristica eterogeneità biologica e clinica dei pazienti, suggerendo l'opportunità di un maggiore approfondimento del ruolo dei biomarcatori periferici nel monitoraggio complessivo dell'asma nel bambino.

Molecole di adesione: ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecole-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecole-1), E-selectina

Il coinvolgimento di un gruppo di molecole di adesione, rappresenta un aspetto critico nei processi infiammatori dell'asma, perché condiziona la capacità delle cellule infiammatorie di aderire e partecipare ai meccanismi in azione. La determinazione dei cambiamenti di *ICAM-1* e *L-selectin* espressi su linfociti del sangue periferico (PB-TLy) e sulle cellule natural killer (NK-CD56+) durante le esacerbazioni in bambini asmatici e successivamente alla terapia steroidea, indica che la riduzione di entrambi i tipi cellulari nella fase acuta, è probabilmente da imputare alla loro rapida migrazione dentro i tessuti polmonari infiammati, seguita dalla fase di recupero post-terapia (67). Molto recentemente Puthothu et al. hanno dimostrato in un elevato numero di bambini asmatici, che un particolare polimorfismo di *ICAM-1* (K469E) correla con i livelli di *sICAM-1*, suggerendo che questa associazione possa svolgere un ruolo fisiopatologico nell'asma pediatrico, nel regolare il traffico leucocitario nei siti di infiammazione (68).

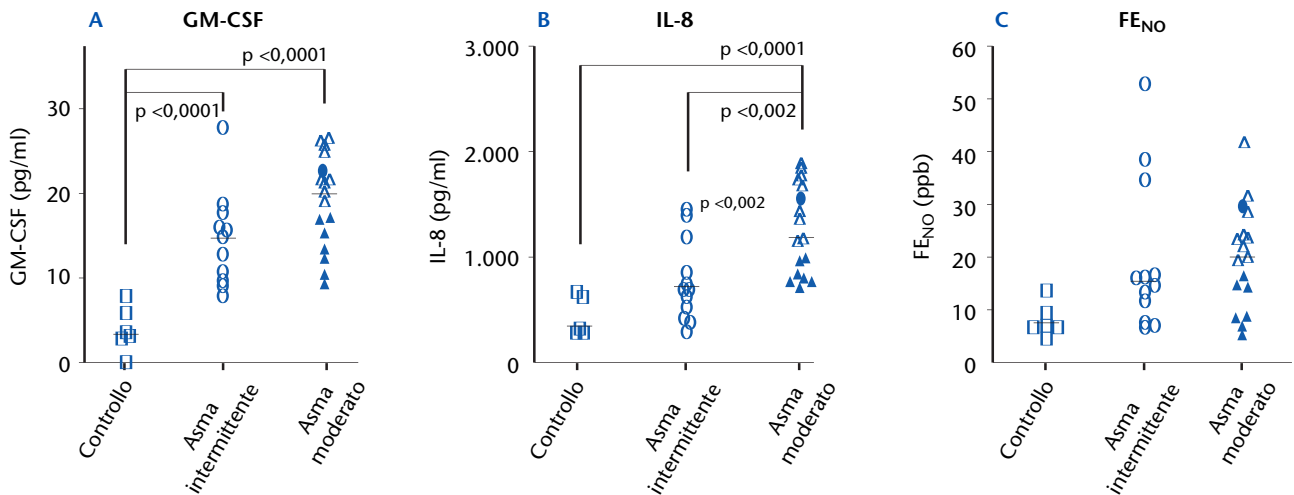


Figura 1 Rilascio di GM-CSF e IL-8 da parte di PBMC e livelli di eNO. Valutazione della concentrazione di IL-8 (A) e GM-CSF (B) e livelli di eNO (C) in 8 soggetti controllo, 12 bambini con asma intermittente e 17 bambini con asma moderato. Sono identificati 2 sottogruppi di bambini con asma moderato, in rapporto a livelli di IL-8 e GM-CSF: "low producers" caratterizzati da basso rilascio di entrambi i mediatori (IL-8 <1,100 ng/ml; GM-CSF <19 pg/ml); "high producers" caratterizzati da elevati livelli di entrambi i mediatori (IL-8 >1,100 ng/ml; GM-CSF >19 pg/ml). Triangoli pieni: "low producers"; Triangoli aperti: "high producers"; Cerchi pieni: bambini non complianti. Modificata da (66).

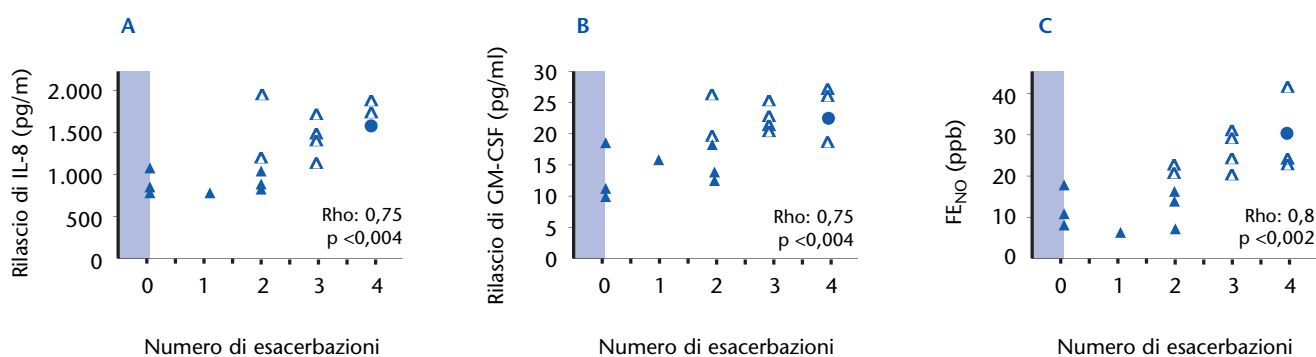


Figura 2 Correlazioni tra numero di esacerbazioni e livelli di marker di infiammazione. Correlazione tra numero di esacerbazioni e rilascio di IL-8 (A), GM-CSF (B) e livelli di eNO (C) in bambini con asma moderato. Triangoli pieni: bambini con asma moderato persistente “low producers”. Triangoli vuoti: bambini con asma moderato persistente “high producers”; Cerchi vuoti: bambini con asma moderato non complianti. Modificata da (66).

Le segnalazioni in letteratura, supportano l'evidenza che i livelli sierici di *sICAM-1*, *sVCAM-1* e *sE-selectin*, rappresentano promettenti marcatori nei bambini della severità dell'infiammazione bronchiale, sia perché l'aumento in fase acuta riflette l'estensione della risposta infiammatoria, sia perché consente di monitorare l'efficacia antinfiammatoria dell'intervento terapeutico (69-71).

Chemochine: MDC (macrophage-derived chemokine), TARC (Thymus and activation-regulated chemokine)

MDC e TARC sono importanti mediatori della flogosi allergica delle vie aeree. Poiché la TARC è responsabile del traffico di linfociti TH2 nei siti di infiammazione, la sua determinazione è stata valutata in diverse condizioni cliniche. Studi recenti hanno dimostrato che TARC ed MDC sono utili marcatori dell'asma cronico, laddove una maggiore concentrazione plasmatica media è misurabile nei pazienti con asma moderato rispetto ai soggetti con asma intermittente (72). Inoltre, l'aumentata concentrazione di TARC si riscontra in pazienti atopici sensibilizzati all'allergene del gatto correlando con il livello di IgE totali nel siero (73). La riduzione del livello plasmatico di TARC, che segue al trattamento dopo la fase di attacco acuto, consente di suggerirne

l'uso come utile marker dell'infiammazione sia nel monitoraggio delle esacerbazioni asmatiche del bambino che nella valutazione dell'efficacia della terapia (74).

Urinary trypsin inhibitor-sUTI

Nelle riacutizzazioni asmatiche il coinvolgimento dei prodotti dell'infiammazione neutrofila, gioca un ruolo importante al pari dei prodotti dell'infiammazione eosinofila. Anche se non si dispone di un marcatore abbastanza sensibile per la valutazione di questa componente, la determinazione di *sUTI* nel siero, può rappresentare il grado di infiammazione di derivazione neutrofila esistente in corso di asma acuto. Pertanto nel bambino, il monitoraggio della concentrazione di *sUTI*, potrebbe costituire il marker dell'infiammazione neutrofila in corso di asma acuto (75).

Nitric Oxide-serum level

eNO è un marker non invasivo che misura l'infiammazione delle vie aeree, la sua validità nel monitoraggio nelle differenti fasi di malattia e in corso di terapia antinfiammatoria, è fortemente supportata da innumerevoli segnalazioni in letteratura. Ben poco è noto sul ruolo di *sNO* nel siero, come marker aggiuntivo nella valutazione della flogosi asmatica. Alcuni Autori, avendo evidenziato

una significativa differenza di valori tra pazienti asmatici e non, suggeriscono la possibilità di uso, soprattutto laddove i bambini mostrino difficoltà ad eseguire eNO con la metodica tradizionale dell'aria esalata (76).

Effetto dei farmaci antiasmatici sui marcatori periferici

Il mancato riscontro di significative riduzioni di *sECP*, *IL-5* e *sCD25* anche a seguito di terapia steroidea (prednisolone) sistemica, evidenzia la persistenza dei fenomeni flogistici nonostante il buon controllo clinico ottenuto con la terapia convenzionale (77). Sebbene Visser et al. riferiscano che la conta degli eosinofili periferici, la *sECP*, i livelli di produzione di *sICAM-1* e di citochine da parte di PBMC, non sono marcatori sensibili nel monitoraggio della terapia e durante gli aggiustamenti posologici degli steroidi inalatori (fluticasone) (78), alcuni Autori sottolineano la correlazione tra aumento di *sECP* nei soggetti non trattati rispetto ai pazienti in terapia di mantenimento con budesonide (79), ed il significato prognostico che tale aumento riveste rispetto ai differenti dosaggi del farmaco (80) ed all'esordio di riacutizzazione (81). Szeffler et al. hanno utilizzato i parametri di controllo dei marker infiammatori periferici (conta eosinofili periferici, *sECP*) in aggiunta ai parametri funzionali ed all'eNO, per delineare quel gruppo di pazienti, caratterizzati da elevati indici di infiammazione e ridotta funzione polmonare, che rispondono con maggiore efficienza al trattamento steroideo inalatorio (fluticasone) (82). In bambini con asma moderato, la riduzione significativa di *sICAM-1* a seguito della terapia steroidea (budesonide), sottolinea ulteriormente l'utile ruolo di *sICAM-1* come marcatore della flogosi asmatica (83). Nell'ambito della terapia associata, steroide inalatorio e broncodilatatore a lunga durata d'azione, è stato dimostrato che l'aggiunta di salmeterolo riduce i livelli di *IL-5* e la conta degli eosinofili periferici (84), e che in bambini con asma lieve persistente esiste un'azione sinergica, potenziata dall'aggiunta del salmeterolo, nell'indurre i meccanismi di apoptosi dei linfociti periferici T-attivati (CD3) (85) (Figura 3).

I risultati degli studi sulle proprietà antinfiammatorie di modulazione dei mediatori periferici di altri farmaci utilizzati nel controllo dei sintomi asmatici indicano, per il formoterolo una riduzione dei livelli di *sECP* e *IL-4* (86), per il triamcinolone (TAA) il

decremento dei livelli di *sECP*, *IL-10* (86) e *sIL-2R* (87), per il montelukast (MLK) un abbassamento dei livelli sierici di *IL-10*, *sECP* (86), *sICAM-1* (88), del numero degli eosinofili periferici e della percentuale di T-linfociti CD11b(+)CD4(+), suggerendo che la capacità di MLK di modulare sui T-linfociti CD4+, l'espressione del ligando (CD11b) per il recettore a bassa affinità per IgE (CD23), possa intervenire nell'interazione con B-cellule CD23+ e quindi nella *downregulation* della sintesi di IgE (89).

Effetto dell'esposizione ad inquinanti ambientali

Numerosi studi epidemiologici riportano l'effetto infiammatorio dell'esposizione ad inquinanti ambientali, con particolare riferimento all'approfondimento dei meccanismi immunologici che sottendono la risposta flogistica. I pazienti asmatici, con la caratteristica condizione di infiammazione delle vie aeree, sono maggiormente sensibili agli effetti flogistici dei differenti agenti inquinanti. L'impatto a breve termine dell'esposizione a particelle di diesel (300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) determina un aumento della conta periferica dei neutrofili ed eosinofili, una *upregulation* delle molecole di adesione e

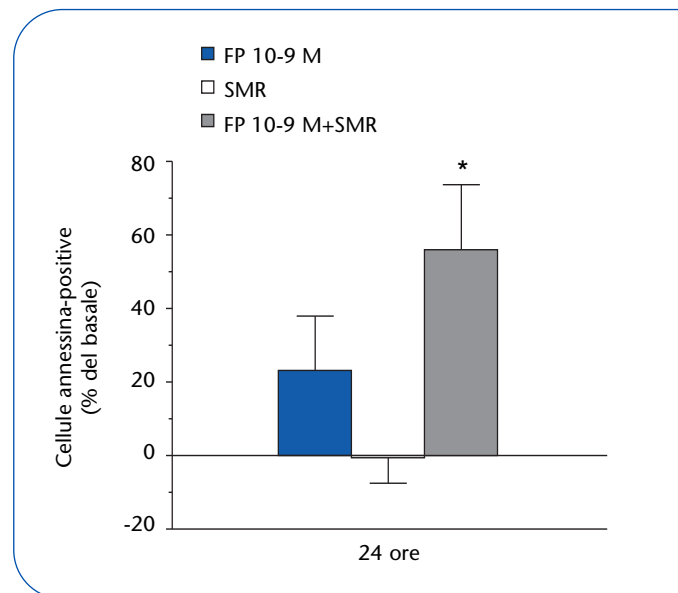


Figura 3 Fluticasone Propionato (FP) e Salmeterolo (SMR) in associazione inducono sinergicamente l'apoptosi in cellule T (CD3) periferiche attivate. * $p < 0,05$ al confronto con FP da solo. Le cellule T PB sono state stimulate per 24 ore in vitro con anti-CD3 in presenza ed in assenza di FP (10-9 M) e salmeterolo (10-7 M) da solo o in associazione. Modificata da (85).

dell'espressione dell'RNA messaggero per *IL-8* (IL-mRNA) ed un aumento di *sIL-10*. Nonostante sia clinicamente documentata una maggiore suscettibilità dei pazienti asmatici all'esposizione alle particelle di diesel, non è ancora del tutto chiaro il ruolo causale diretto dell'induzione dell'infiammazione neutrofila o quello indiretto del peggioramento della preesistente infiammazione delle vie aeree e della reattività bronchiale. Sembra però, che quest'ultima condizione comporti la maggiore suscettibilità del paziente asmatico ai inquinanti (90).

L'esposizione a PM 2,5 in pazienti asmatici, determina l'aumento di alcuni biomarker periferici dell'infiammazione, come la *sICAM-1* e la *IL-6*, suggerendo la necessità di ulteriori valutazioni degli effetti biologici in risposta al fattore inquinante (91).

Le particelle ultrafini (UFPs con diametro <100 nm) possono aggravare gli effetti da esposizione ai inquinanti, soprattutto nei soggetti ad alto rischio. Infatti, negli asmatici a riposo vi è un maggiore deposito rispetto ai soggetti sani (92), con maggiore infiammazione polmonare. Inoltre, la capacità di attraversare l'epitelio bronchiale ed entrare nel circolo sistemico giustifica gli effetti sulle funzioni dell'endotelio vascolare. Nei pazienti con asma lieve è possibile evidenziare una ridotta espressione di *CD11b* su monociti ed eosinofili ed una ridotta espressione di *ICAM-1* su PBMC (93). Recentemente è stato segnalato in soggetti asmatici che l'inalazione di particelle ultrafini, riduce la percentuale periferica di linfociti CD4+, basofili, eosinofili, ed anche l'espressione di CD54 sui granulociti (94).

Il riscontro dell'alterata distribuzione dei globuli bianchi periferici, a seguito dell'esposizione ad agenti inquinanti, suggerisce il ruolo critico dell'aumentata presenza di neutrofili nel letto vascolare polmonare e la necessità di valutare attentamente nel paziente asmatico, gli effetti infiammatori sistemici dell'impatto nocivo ambientale.

Conclusioni

La valutazione integrata di marker dell'infiammazione, parametri funzionali e punteggio dei sintomi, può certamente migliorare il controllo dell'asma. Vi sono numerose segnalazioni, talvolta controverse, in merito alle correlazioni tra la funzione polmonare, l'atopia, l'eNO, ed i marker dell'infiammazione bronchiale misurati sul sangue periferico, che suggeriscono probabilmente la presenza di una grande eterogeneità tipica dell'asma del bambino. In questa ottica, i risultati dello studio di Leung et al. dimostrano che nell'asma pediatrico i marcatori periferici dell'infiammazione possono essere differenzialmente regolati ed esiste una debole correlazione tra parametri clinici, atopici ed infiammatori. Pertanto, i marcatori di flogosi bronchiale nel sangue periferico, non sovrapponendosi ad altri parametri di monitoraggio nel paziente asmatico stabile, dovrebbero comunque rientrare nell'approccio di routine per il controllo dell'asma (95).

Vi è però da sottolineare che necessitano di ulteriore approfondimento il ruolo dei marcatori periferici dell'infiammazione bronchiale e le future applicazioni nella diagnosi precoce ed in campo prognostico, in riferimento soprattutto al loro specifico valore rispetto ai dati clinici.

Bibliografia

1. Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention*. NIH Publication No 02-3659. Bethesda, MD: NHLBI, 2004.
2. Wennwergren. *Inflammatory mediators in blood and urine*. Paediatr Respir Rev. 2000; 1: 259-265.
3. Vignola AM, La Grutta S, Chiappara G, et al. *Cellular network in airways inflammation and remodelling*. Paediatr Respir Rev 2002; 3: 41-46.
4. Fredens K, Dahl R, Venge P. *The Gordon phenomenon induced by eosinophil cationic protein and eosinophil protein-X*. J Allergy Clin Immunol 1982; 70: 361-366.
5. Gleich GJ, Adolphson CR. *The eosinophil leucocyte structure and function*. Adv Immunol 1986; 39: 177-253.
6. Reimert CM, Poulsen LK, Bindlev-Jensen C, et al. *Measurement of eosinophil protein X/derived neurotoxin (EPX,EDN). Time and temperature dependent spontaneous release in vitro demands standardized sample processing*. J Immunol Meth 1993; 166: 183-190.
7. Strunk RC, Szeffler SJ, Phillips BR, et al. *Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children*. J Allergy Clin Immunol 2003; 112: 883-892.
8. Niggemann B, Kleinau I, Schmitt M, et al. *Twenty-four-hour time course of eosinophil granule proteins ECP and EPX during bronchial allergen challenges in serum of asthmatic children*. Allergy 1994; 49: 74-80.
9. Hughes JM, Rimmer SJ, Salome CM, et al. *Eosinophila interleukin-5, and tumour necrosis factor-alpha in asthmatic children*. Allergy 2001; 56: 412-418.
10. Grebski E, Wu J, Wuthrich B, et al. *Does eosinophil cationic protein in sputum and blood reflect bronchial inflammation and obstruction in allergic asthmatics?* J Investig Allergol Clin Immunol 1999; 9: 82-88.
11. Parra A, Sanz ML, Vila L, et al. *Eosinophil soluble protein levels, eosinophil peroxidase and eosinophil cationic protein in asthmatic patients*. J Investig Allergol Clin Immunol 1999; 9: 27-34.
12. Scher H, Berman D, Weinberg EG, et al. *Granulocyte proteins in serum in childhood asthma: relation to spirometry and therapy*. Clin Exp Allergy 1996; 26: 1131-1141.
13. Lonkvist K, Hallden G, Dahlen SE, et al. *Markers of inflammation and bronchial reactivity in children with asthma, exposed to animal dander in school dust*. Pediatr Allergy Immunol 1999; 10: 45-52.
14. Venge P, Byström J, Carlsson M, et al. *Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease*. Clin Exp Allergy 1999; 29: 1172-1186.
15. Nja F, Roksund OD, Carlsen KH, et al. *Eosinophil cationic protein (ECP) in school children living in a mountainous area of Norway: a population-based study of ECP as a tool for diagnosing asthma in children with reference values*. Allergy 2001; 56: 138-144.
16. Carlsen KH, Halvorsen R, Pettersen M, et al. *Inflammation markers and symptom activity in children with bronchial asthma. Influence of atopy and eczema*. Pediatr Allergy Immunol 1997; 8: 112-120.
17. Vila-Indurain B, Munoz-Lopez F, Martin-Mateos M. *Evaluation of blood eosinophilia and the eosinophil cationic protein (ECP) in the serum of asthmatic children with varying degree of severity*. Allergol Immunopathol 1999; 27: 304-308.
18. Koller DY, Halmerbauer G, Frischer T, et al. *Assessment of eosinophil granule proteins in various body fluids: is there a relation to clinical variables in childhood asthma?* Clin Exp Allergy 1999; 29: 786-793.
19. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, et al. *Exhaled nitric oxide, serum ECP and airway responsiveness in mild asthmatic children*. Eur Respir J 2000; 15: 839-843.
20. Wilson NM, James A, Uasuf C, et al. *Asthma severity and inflammation markers in children*. Pediatr Allergy Immunol 2001; 12: 125-132.
21. Niimi A, Amitani R, Suzuki K, et al. *Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophilic inflammation in asthma*. Clin Exp Allergy 1998; 28: 233-240.

- 22.** Prehn A, Seger RA, Faber J, et al. *The relationship of serum-eosinophil cationic protein and eosinophil count to disease activity in children with bronchial asthma.* *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9: 197-203.
- 23.** Kristjansson S, Shimizu T, Strannegard IL, et al. *Eosinophil cationic protein, myeloperoxidase and tryptase in children with asthma and atopic dermatitis.* *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5: 223-229.
- 24.** Fujisawa T, Terada A, Atsuta J, et al. *Clinical utility of serum levels of eosinophil cationic protein (ECP) for monitoring and predicting clinical course in childhood asthma.* *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 19-25.
- 25.** Tang RB, Chen SJ. *Serum levels of eosinophil cationic protein and eosinophils in asthmatic children during a course of prednisolone therapy.* *Pediatr Pulmonol* 2001; 31: 121-125.
- 26.** Villa JR, Garcia G, Rueda S, et al. *Serum eosinophilic cationic protein may predict clinical course of wheezing in young children.* *Arch Dis Child* 1998; 78: 448-452.
- 27.** Pifferi M, Ragazzo V, Caramella D, et al. *Eosinophil cationic protein in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis: predictive value for subsequent development of persistent wheezing.* *Pediatr Pulmonol* 2001; 31: 419-424.
- 28.** Lodrup Carlsen KC, Halvorsen R, Carlsen KH. *Serum inflammatory markers and effects of age and tobacco smoke exposure in young non-asthmatic children.* *Acta Paediatr* 1998; 87: 559-564.
- 29.** Wolthers OD, Heuck C. *Circadian variations in serum eosinophil cationic protein, and serum and urine eosinophil protein X.* *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 130-133.
- 30.** Ferdousi HA, Munir AK, Zetterstrom O, et al. *Seasonal differences of peak expiratory flow rate variability and mediators of allergic inflammation in non-atopic adolescents.* *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12: 238-246.
- 31.** Wolthers OD. *Eosinophil granule proteins in the assessment of airway inflammation in pediatric bronchial asthma.* *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 248-254.
- 32.** Stelmach I, Majak P, Grzelewski T, et al. *The ECP/Eo count ratio in children with asthma.* *J Asthma* 2004; 41: 539-546.
- 33.** Fujitaka M, Kawaguchi H, Kato Y, et al. *Significance of the eosinophil cationic protein/eosinophil count ratio in asthmatic patients: its relationship to disease severity.* *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 86: 323-329.
- 34.** Imai C, Yamazaki H, Tanaka Y, et al. *Ratio of eosinophil cationic protein/eosinophil count as a new marker in children with asthma.* *Pediatr Int* 1999; 41: 142-146.
- 35.** Rao R, Frederick JM, Enander I, et al. *Airway function correlates with circulating eosinophil, but not mast cell, markers of inflammation in childhood asthma.* *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 789-793.
- 36.** Krug N, Napp U, Enander I, et al. *Intracellular expression and serum levels of eosinophil peroxidase (EPO) and eosinophil cationic protein in asthmatic children.* *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1507-1515.
- 37.** Roquet A, Hallden G, Ihre E, et al. *Eosinophil activity markers in peripheral blood have high predictive value for bronchial hyperreactivity in patients with suspected mild asthma.* *Allergy* 1996; 51: 482-488.
- 38.** Boner AL, Peroni DG, Piacentini GL, et al. *Influence of allergen avoidance at high altitude on serum markers of eosinophil activation in children with allergic asthma.* *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 1021-1026.
- 39.** Rasmussen F, Lambrechtsen J, Siersted HC, et al. *Increased eosinophil cation protein level in sensitized nonasthmatics is linked to subsequent hyperresponsiveness to methacholine. The Odense Schoolchild Study.* *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 129-136.
- 40.** Sanz ML, Parra A, Prieto I, et al. *Serum eosinophil peroxidase (EPO) levels in asthmatic patients.* *Allergy* 1997; 52: 417-422.
- 41.** Wempe JB, Tammelling E, Koeter GH, et al. *Blood eosinophil numbers and activity during 24 hours: effects of treatment with budesonide and bambuterol.* *J Allergy Clin Immunol* 1999; 90: 757-765.
- 42.** Warner JO, Warner JA, Pohunek P, et al. *Markers of allergy and inflammation.* *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9 (Suppl. 11): S53-57.

- 43.** Hoekstra MO, Grol MH, Hovenga H, et al. *Eosinophil and mast cell parameters in children with stable moderate asthma.* *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9: 143-149.
- 44.** Payne DN, James A, Uasuf C, et al. *Asthma severity and inflammation markers in children.* *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:125-132.
- 45.** Shirai T, Inui N, Suda T, et al. *Correlation between peripheral blood T-cell profiles and airway inflammation in atopic patients.* *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 622-626.
- 46.** Shi HZ, Sun JJ, Pan HL, et al. *Alterations of T-lymphocyte subsets, soluble IL-2 receptor, and IgE in peripheral blood of children with acute asthma attacks.* *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 388-394.
- 47.** Gemou-Engesaeth V, Bush A, Kay AB, et al. *Inhaled glucocorticoid therapy of childhood asthma is associated with reduced peripheral blood T cell activation and 'Th2-type' cytokine mRNA expression.* *Pediatrics* 1997; 99: 695-703.
- 48.** Doi S, Murayama N, Inoue T, et al. *CD4 T-lymphocyte activation is associated with peak expiratory flow variability in childhood asthma.* *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 955-962.
- 49.** Guarnaccia S, Kurman CC, La Grutta S, et al. *Serum soluble interleukin-2-receptor (IL-2R) in children with allergic disorders.* *Ann Allergy Immunol* 1993; 71: 259-261.
- 50.** Lee SY, Kim SJ, Kwon SS, et al. *Distribution and cytokine production of CD4 and CD8 T-lymphocyte subsets in patients with acute asthma attacks.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 659-664.
- 51.** Tang RB, Chen SJ. *Soluble interleukin-2 receptor and interleukin-4 in sera of asthmatic children before and after a prednisolone course.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 314-317.
- 52.** Kim JT, Kim CK, Koh YY. *Serum levels of soluble interleukin-2 receptor at acute asthma exacerbation: relationship with severity of exacerbation and bronchodilator response.* *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 263-269.
- 53.** Pumputiene I, Emuzyte R, Dubakiene R, et al. *T cell and eosinophil activation in mild and moderate atopic and nonatopic children's asthma in remission.* *Allergy* 2006; 61: 43-48.
- 54.** Noma T, Sugawara Y, Aoki K, et al. *Induction of peripheral mononuclear cell apoptosis in asthmatic patients in remission.* *J Asthma* 2002; 39: 591-601.
- 55.** Lara-Marquez ML, Moan MJ, Cartwright S, et al. *Atopic asthma: differential activation phenotypes among memory T helper cells.* *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1232-1241.
- 56.** Huang CS, Chen SJ, Chung RL, et al. *Serum interleukin-5 measurements for monitoring acute asthma in children.* *J Asthma* 2005; 42: 297-300.
- 57.** Ceyhan BB, Enc FY, Sahin S. *IL-2 and IL-10 levels in induced sputum and serum samples of asthmatics.* *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004; 14: 80-85.
- 58.** Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, et al. *Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways.* *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 579-587.
- 59.** Halasz A, Cserhati E, Kosa L, et al. *Relationship between the tumor necrosis factor system and the serum interleukin-4, interleukin-5, interleukin-8, eosinophil cationic protein, and immunoglobulin E levels in the bronchial hyperreactivity of adults and their children.* *Allergy Asthma Proc* 2003; 24: 111-118.
- 60.** Mwamtemi HH, Koike K, Kinoshita T, et al. *An increase in circulating mast cell colony-forming cells in asthma.* *J Asthma* 2001; 166: 4672-4677.
- 61.** Wang CH, Hsieh WY, Shih LY, et al. *Increased progenitor cell proliferation in the peripheral blood of patients with bronchial asthma: the role of nitric oxide.* *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 803-810.
- 62.** Garty BZ, Monselise Y, Nitzan M. *Soluble CD14 in children with status asthmaticus.* *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 104-107.
- 63.** Verdegaal EM, Zegveld ST, Blokland I, et al. *Expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes from patients with asthma stimulated in vitro with interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1.* *Inflammation* 1998; 22: 229-242.
- 64.** Gagliardo R, Chanez P, Mathieu M, et al. *Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma.* *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1490-1495.
- 65.** Tang RB, Chen SJ. *Evaluation of serum interleukin-8 as a marker of disease activity in acute asthma in children.* *J Asthma* 2000; 37: 409-413.

- 66.** La Grutta S, Gagliardo R, Mirabella F, et al. *Clinical and biological heterogeneity in children with moderate asthma.* Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 1490-1495.
- 67.** Lin SJ, Chang LY, Yan DC, et al. *Decreased intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and L-selectin (CD62L) expression on peripheral blood natural killer cells in asthmatic children with acute exacerbation.* Allergy 2003; 58: 67-71.
- 68.** Puthothu B, Krueger M, Bernhardt M, et al. *ICAM1 amino-acid variant K469E is associated with paediatric bronchial asthma and elevated sICAM1 levels.* Genes Immun 2006; 7: 322-326.
- 69.** Oymar K, Bjercknes R. *Differential patterns of circulating adhesion molecules in children with bronchial asthma and acute bronchiolitis.* Pediatr Allergy Immunol 1998; 9: 73-79.
- 70.** El-Sawy IH, Badr-El-Din OM, El-Azzouni OE. *Soluble intercellular adhesion molecule-1 in sera of children with bronchial asthma exacerbation.* Int Arch Allergy Immunol 1999; 119: 126-132.
- 71.** Tang RB, Chen SJ, Soong WJ, Chung RL. *Circulating adhesion molecules in sera of asthmatic children.* Pediatr Pulmonol 2002; 33: 249-254.
- 72.** Leung TF, Wong GW, Ko FW, et al. *Increased macrophage-derived chemokine in exhaled breath condensate and plasma from children with asthma.* Clin Exp Allergy 2004; 34: 786-791.
- 73.** Leung TF, Wong CK, Chan IH, et al. *Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol 2002; 110: 404-409.
- 74.** Leung TF, Wong CK, Lam CW, et al. *Plasma TARC concentration may be a useful marker for asthmatic exacerbation in children.* Eur Respir J 2003; 21: 616-620.
- 75.** Yasui K, Kanda H, Iwanami T, et al. *Increased serum concentration of urinary trypsin inhibitor with asthma exacerbation.* Eur Respir J 2003; 22: 739-742.
- 76.** de Arruda-Chaves E, De Conti D, Tebaldi T. *Nitric oxide sera levels as an inflammatory marker in asthma.* J Investig Allergol Clin Immunol 2002; 12: 120-123.
- 77.** Sahid El-Radhi A, Hogg CL, et al. *Effect of oral glucocorticoid treatment on serum inflammatory markers in acute asthma.* Arch Dis Child 2000; 83: 158-162.
- 78.** Visser MJ, Postma DS, Brand PL, et al. *Influence of different dosage schedules of inhaled fluticasone propionate on peripheral blood cytokine concentrations in childhood asthma.* Clin Exp Allergy 2002; 32: 1497-1503.
- 79.** Lonnkvist K, Anderson M, Hedlin G, et al. *Exhaled NO and eosinophil markers in blood, nasal lavage and sputum in children with asthma after withdrawal of budesonide.* Pediatr Allergy Immunol 2004; 15: 351-358.
- 80.** Prehn A, Seger RA, Torresani T, et al. *Evaluation of a clinical algorithm involving serum eosinophil cationic protein for guiding the anti-inflammatory treatment of bronchial asthma in childhood.* Pediatr Allergy Immunol 2000; 11: 87-94.
- 81.** Lonnkvist K, Hellman C, Lundahl J, et al. *Eosinophil markers in blood, serum, and urine for monitoring the clinical course in childhood asthma: impact of budesonide treatment and withdrawal.* J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 812-817.
- 82.** Szefer SJ, Phillips BR, Martinez FD, et al. *Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol 2005; 115: 233-242.
- 83.** Cengizlier R, Demirpolat E, Tulek N, et al. *Circulating ICAM-1 levels in bronchial asthma and the effect of inhaled corticosteroids.* Ann Allergy Asthma Immunol 2000; 84: 539-541.
- 84.** Koopmans JG, Lutter R, Jansen HM, et al. *Adding salmeterol to an inhaled corticosteroid reduces allergen-induced serum IL-5 and peripheral eosinophils.* J Allergy Clin Immunol 2005; 116: 1007-1013.
- 85.** Pace E, Gagliardo R, La Grutta S, et al. *Synergistic effects of fluticasone propionate and salmeterol on in vitro T-cell activation and apoptosis in asthma.* J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1216-1223.
- 86.** Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. *A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, antileukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma.* Clin Exp Allergy 2002; 32: 264-269.

- 87.** Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. *Markers of allergic inflammation in peripheral blood of children with asthma after treatment with inhaled triamcinolone acetonide.* *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87: 319-326.
- 88.** Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. *A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with montelukast on bronchial hyperresponsiveness and serum eosinophilic cationic protein (ECP), soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R), IL-4, and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) in children with asthma.* *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 257-263
- 89.** Gago A, Aberle N, Rabatic S, et al. *Effect of cysteinyl leukotriene receptor antagonist on CD11b and CD23 expression in asthmatic children.* *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 939-944.
- 90.** Holgate ST, Sandstrom T, Frew AJ, et al. *Health effects of acute exposure to air pollution. Part I: Healthy and asthmatic subjects exposed to diesel exhaust.* *Res Rep Health Eff Inst* 2003; 112: 1-30.
- 91.** Gong H Jr, Sioutas C, Linn WS, et al. *Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient particles in metropolitan Los Angeles.* *Res Rep Health Eff Inst* 2003; 118: 1-36.
- 92.** Chalupa DC, Morrow PE, Oberdorster G, et al. *Ultrafine particle deposition subjects with asthma.* *Environ Health Perspect* 2004; 112: 879-882.
- 93.** Frampton MW, Utell MJ, Zareba W, et al. *Effects of exposure to ultrafine carbon particles in healthy subjects and subjects with asthma.* *Res Rep Health Eff Inst* 2004; 126: 1-47.
- 94.** Frampton MW, Stewart JC, Oberdorster G, et al. *Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules humans.* *Environ Health Perspect* 2006; 114: 51-58.
- 95.** Leung TF, Wong GW, Ko FW, et al. *Clinical and atopic parameters and airway inflammatory markers in childhood asthma: a factor analysis.* *Thorax* 2005; 60: 822-826.

Alessandro Fiocchi, Luigi Terracciano, Alberto Martelli, Teresita Sarratud

Ospedale "M. Melloni", Milano

Il ruolo delle IgE nell'asma

The role of IgE in asthma

Parole chiave: asma, allergia, IgE

Key words: asthma, allergy, IgE

Riassunto. Nella complessa multifattorialità dell'asma, i fattori allergici possono giocare un ruolo nella genesi dell'ostruzione e dell'infiammazione bronchiale. I legami tra l'allergia inalatoria e l'asma sono così stretti da rendere irrinunciabile una diagnosi di sensibilizzazione allergica nel percorso diagnostico del bambino asmatico: l'allergia ad inalanti è associata con la prevalenza della malattia asmatica, con il numero e la severità delle riacacerbazioni, con lo sviluppo della malattia nel lattante. In questo articolo rivediamo il ruolo della sensibilizzazione allergica nell'asma del bambino e della sua valutazione mediante prick test, dosaggio delle IgE circolanti e l'uso di pannelli. Rivedremo inoltre il loro valore nella predizione dell'andamento della malattia nel lattante.

Accettato per la pubblicazione il 7 dicembre 2006.

Corrispondenza: Prof. Alessandro Fiocchi, Ospedale "M. Melloni", Via Melloni 52, 20129 Milano; e-mail: allerg@tin.it

Introduzione

Le IgE sono un ponte che lega da una parte la ricognizione di allergeni specifici e dall'altra l'attivazione di cellule dotate dei recettori per le IgE, che attraverso una cascata di risposte immediate e ritardate portano verso l'asma IgE-mediato. Il legame tra IgE ed asma nel bambino è illustrato da una serie di dati epidemiologici. Nel decorso dell'asma allergico la sensibilizzazione è talmente precoce che in età scolare l'88% dei bambini con asma sono sensibilizzati ad almeno un allergene (1). Nell'età prescolare, quando più frequenti sono gli episodi di asma da infezioni respiratorie virali, la sensibilizzazione allergica è associata con persistenza della malattia (2). L'esposizione di bambini sensibilizzati ad elevati livelli dell'allergene corrispondente determina un peggioramento della malattia asmatica (3), mentre la loro eliminazione od importante riduzione conduce ad un miglioramento della malattia (4). Queste considerazioni formano la base della necessità di riconoscere la presenza di allergie nel bambino, per poter predire l'asma o trattarla mediante provvedimenti ambientali o immunoterapia

specifici. In questo articolo, richiamati alcuni concetti sulla risposta immune IgE, rivedremo il ruolo del dosaggio delle IgE specifiche nell'asma.

La risposta immune IgE

Nell'asma la sensibilizzazione allergica si realizza in seguito al contatto con allergeni respiratori che inducono lo *switch* isotipico delle B-cells in senso IgE (5). Questo fenomeno pare svilupparsi non soltanto nei centri germinativi dei linfonodi regionali, ma anche nella compagine della medesima via aerea. A mediare la risposta allergica è il recettore ad alta affinità per le IgE (FC ϵ RI), identificabile con il monoclonale CD25 (6). Si tratta di una molecola multimerica, formata da una catena α , una catena β e due catene γ . La catena α lega le IgE, le catene γ innescano il segnale intracellulare, mentre la catena β è responsabile unicamente dell'amplificazione del segnale. Il recettore esiste anche in forma priva della catena β (7). FC ϵ RI è presente sulla superficie delle mastcellule della mucosa respiratoria, così

come sui basofili circolanti. Il recettore lega le IgE circolanti mantenendole alla superficie delle cellule; in presenza di allergene, si realizza un legame a ponte tra due molecole di IgE, che induce l'attivazione di diverse vie segnalatiche fino alla realizzazione di una serie di processi effettori, tra cui la secrezione di mediatori dell'allergia e l'induzione di citochine come l'IL-4, l'IL-6, il TNF- α ed il GM-CSF. Tali risposte, centrali per l'induzione ed il mantenimento dell'infiammazione allergica, sono le medesime che conferiscono la protezione fisiologica dalle infestazioni parassitarie (8).

Il fatto che le IgE siano nel siero in concentrazione assai più bassa delle altre immunoglobuline suggerisce che un loro stretto controllo sia necessario per prevenire effetti potenzialmente dannosi della flogosi IgE mediata. Ad assicurarlo, il bilancio tra le diverse sottopopolazioni T cellulari svolge un ruolo fondamentale (9). Benché negli ultimi anni siano state identificate numerose popolazioni di T-regolatori (10), il ruolo meglio chiarito resta quello dei regolatori della serie T-helper. Queste cellule, caratterizzate dalla presenza dell'antigene CD4 alla loro superficie, sono designate come CD4 e vengono subclassificate nelle due grandi classi T-helper tipo 1 e 2 (Th1 e Th2) sulla base della loro secrezione di citochine. I Th1 sono prevalentemente deputati a mobilitare le difese cellulari contro i patogeni intracellulari, mentre i Th2 coordinano la risposta ai grandi patogeni extracellulari come gli elminti. Le citochine Th2, soprattutto IL-4 ed IL-13, agiscono direttamente sulla sintesi delle IgE ed altre citochine Th2 sono responsabili del reclutamento degli eosinofili, che a loro volta producono IL-4. Il bilancio tra reazioni Th-1 e Th2, critico nel determinare lo sviluppo di allergia IgE-mediata, è orientato dall'azione delle cellule dendritiche (11) ed influenzato dal milieu infiammatorio e da fattori genetici ed ambientali.

Ruolo delle IgE nell'asma

L'aspetto istologico dei bronchi affetti da asma rivela l'infiltrazione nella parete bronchiale di cellule (Th2), di mastociti e di eosinofili. I pochi studi sui bambini rilevano eosinofilia nel BAL anche in periodi clinicamente silenti (12), suggerendo che gli eosinofili nelle vie aeree siano attivati anche in assenza di sintomi clinici in corso. Anche l'analisi di biopsie ottenute prima dell'inizio dei sintomi clinici e/o della diagnosi di asma ha confermato le alterazioni patologiche, con infiltrazione eosinofila della

lamina propria ed ispessimento della membrana basale (13). Poiché i livelli di IgE sono nel bambino correlati con l'eosinofilia e con altri dati di infiammazione allergica (14), si ritiene che la presenza di queste cellule sia effetto finale della reazione allergica scatenata nella parete bronchiale, in presenza di un appropriato milieu citochinico, da allergeni respiratori cui l'individuo è sensibilizzato.

Mentre la media delle IgE nella popolazione generale è di circa 30 UI/mL (15), nei pazienti asmatici essa è di 106,6 UI/mL (15). I bambini, soprattutto di sesso maschile, hanno livelli più alti degli adulti e nei giovani con asma la media delle IgE raggiunge le 224 UI/mL (16). Nel gruppo TENOR, tra gli oltre 4.000 pazienti affetti da asma non solo sono i bambini ad avere i maggiori livelli di IgE (Figura 1), ma gli adulti con asma iniziato in età infantile hanno livelli di IgE maggiori rispetto a quelli con asma iniziato nell'età adulta. Inoltre i livelli di IgE totali sono maggiori nei pazienti con asma severo persistente rispetto a quelli con asma lieve o moderato persistente (Figura 2), suggerendo un ruolo dell'atopia nella genesi dell'asma severo, un risultato che conferma dati meno recenti provenienti dall'Australia (17).

Un altro fattore importante è l'etnia; nei neri le IgE sono più elevate che nei bianchi, e negli asiatici ancora di più (18). La distribuzione razziale potrebbe essere dovuta al più basso stato socioeconomico degli afro-americani, che presentano asma con alta incidenza e severità, ma in uno studio sulla "inner city asthma" è stato documentato che anche al netto delle differenze di tipo socioeconomico ed a parità di sensibilizzazione per allergeni respiratori, questi bambini presentano livelli di IgE totali più elevati di quelli dei compagni di razza caucasica (19). Anche questa osservazione conferma che lo stato atopico è di per sé associato con le forme d'asma che conducono più frequentemente alla ospedalizzazione ed al ricorso al pronto soccorso. L'interpretazione del ruolo delle IgE nell'asma nei grandi studi epidemiologici è spesso limitata dal fatto che in essi la malattia è considerata indipendentemente dalla sua eziologia. In realtà, fino dai primi tentativi di classificazione della malattia è stato chiaramente accettato che alcuni gruppi di pazienti con asma non sono atopici (il cosiddetto asma intrinseco [20]) e questa distinzione mantiene a tutt'oggi il suo significato (21, 22). In questi pazienti non vi è atopia secondo nessuna delle definizioni precedentemente fornite, non vi è familiarità di allergia ed i livelli di IgE totali e specifiche

circolanti sono normali. È stato suggerito che gli asmatici intrinseci siano allergici ad un allergene non determinato, sia per il fatto che spesso rispondono favorevolmente ad un evitamento di allergeni sia perché il loro profilo immunopatologico è indistinguibile. Un'altra ipotesi è che questi pazienti siano allergici ad un allergene localizzato; lo suggerisce il fatto che nei bronchi dei soggetti asmatici, anche non allergici, si trovano elevati livelli di eosinofili EG2, di basofili BBI, di

cellule CD25(23), elevati livelli di citochine associate ai Th2 ed agli eosinofili (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF), elevati livelli di recettori per le citochine (IL-4Ra, IL-5Ra, GM-CSFRa), elevati livelli di chemochine (Eotassina, Eotassina-2, RANTES), e molte cellule recanti il recettore FCεRII (24). Se questa interpretazione è corretta, anche per i gruppi di bambini con asma intrinseco lo stato atopico è rilevante per lo sviluppo della malattia.

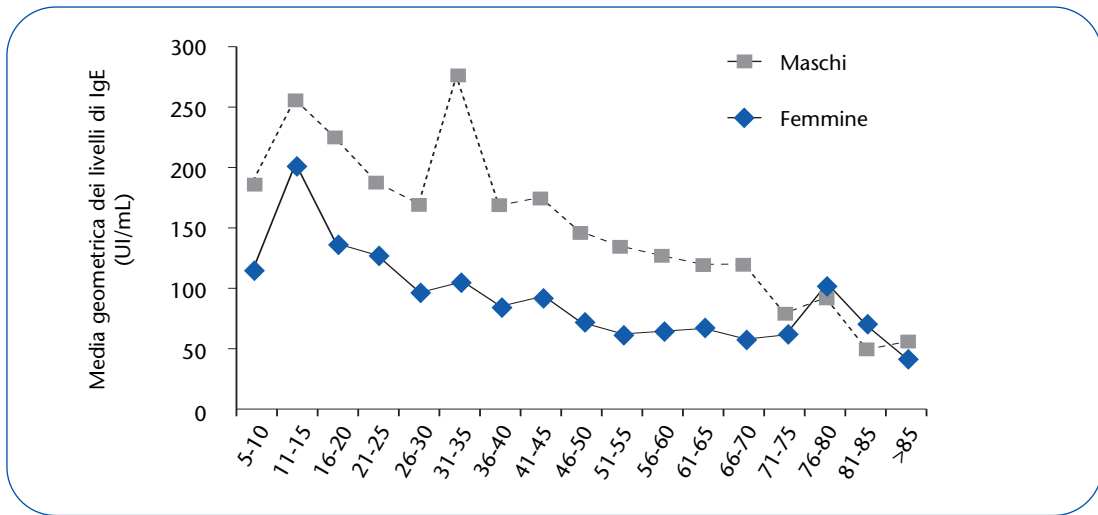


Figura 1 IgE nel gruppo TENOR (The Epidemiology and Natural history Of Asthma): confronto tra le differenti classi di età. $p < 0,001$ per i bambini vs. adulti.

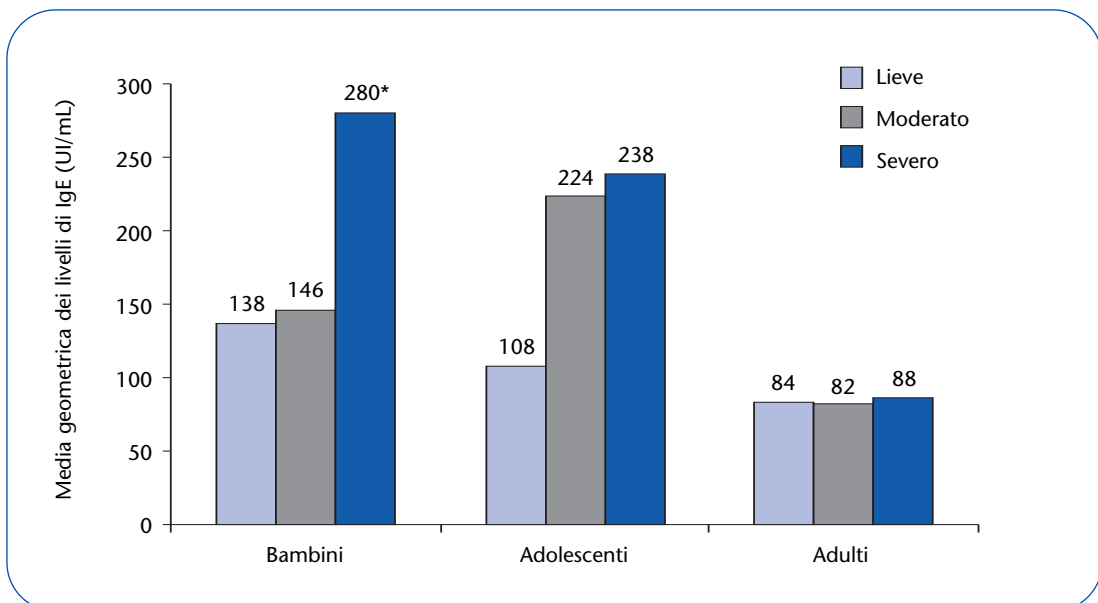


Figura 2 IgE nel gruppo TENOR (The Epidemiology and Natural history Of Asthma): confronto tra le differenti classi di severità dell'asma nelle diverse età. $p < 0,001$ per i bambini con asma severo rispetto a quelli con asma lieve e moderato.

La diagnosi di sensibilizzazione ad aeroallergeni

Lo stato atopico può essere diagnosticato mediante la presenza di *prick test* positivi per i comuni allergeni, la ricerca nel sangue di IgE specifiche, la documentazione di un elevato livello di IgE totali, la presenza di eosinofili e di loro mediatori. Negli atopici, la proporzione di IgE diretta contro allergeni – che nel bambino normale non supera l'1% – può arrivare al 40% (25). L'uso di questi dosaggi può essere utilizzato per la gestione quotidiana dell'asma del bambino, come accennato in introduzione. È infatti associato che la sensibilizzazione ad aeroallergeni gioca un ruolo di primo piano nello sviluppo dell'asma (26) e che lo stato atopico è un predittore della risposta alla terapia antiasmatica (27). Inoltre, la sensibilizzazione e l'esposizione ad alti livelli di allergeni è un fattore decisivo per lo scatenamento di asma (28), per la sua morbilità, per la sua gravità e per la sua prognosi (29). Per allergeni perenni esiste una relazione dose-dipendente tra esposizione e sviluppo di asma (30) ma, sebbene studi in bambini sensibilizzati suggerissero che l'esposizione agli acari domestici determini non solo il rischio di sensibilizzazione allergica ma anche il rischio d'asma e addirittura il tempo d'inizio della malattia (31), la situazione appare oggi non così chiara. Di fatto, sappiamo con certezza che l'esposizione allergenica è importante per lo sviluppo d'asma e che è importante identificare e trattare le manifestazioni precoci del fenotipo atopico (32, 33).

Lo stato atopico può essere monitorato mediante il test cutaneo (*skin prick test*; SPT), il dosaggio di IgE specifiche, ed il dosaggio di pannelli di IgE, oltre che attraverso l'uso di *biomarker* della attivazione infiammatoria (soprattutto eosinofila) la cui disamina esula da questo articolo.

Il prick test

I test di sensibilizzazione ad inalanti indoor possono essere usati per individuare fattori scatenanti ambientali e per eliminarli (34), così come per identificare allergie alimentari nei bambini con asma severo, in cui questo può rappresentare un fattore di aggravamento (35).

Traggo dalle Linee Guida GINA: "Le prove allergometriche cutanee rappresentano lo strumento diagnostico di primo livello per evidenziare lo stato atopico e i *prick test* sono quelli più comunemente usati nella pratica clinica. Le loro caratteristiche di semplicità, rapidità di esecuzione, basso costo, fanno sì che

debbano essere considerati il primo approccio diagnostico, ma occorre sottolineare che, in taluni casi, possono dar luogo a falsi positivi o falsi negativi (36)". I test cutanei sono semplici da eseguire, rapidi, poco dispendiosi ed altamente sensibili nella identificazione della sensibilizzazione allergica. Debbono essere eseguiti da operatori esperti, per la possibilità di incorrere in errori tecnici. Le loro caratteristiche di performance sono meglio definite nell'allergia alimentare che in quella respiratoria (37, 38), ed il loro valore predittivo negativo – così come il loro valore di screening – non sono definiti per l'asma nel bambino. Causa principale di falsi positivi è il dermatografismo di qualsivoglia natura (costituzionale, nel corso di orticaria, se è presente dermatite atopica estesa...). Possono esporre a falsi negativi in caso di iporeattività cutanea, durante l'uso di antistaminici oppure per l'impiego di estratti allergenici incongrui; di particolare rilevanza per l'asma è il fatto che anche il trattamento con alte dosi di steroidi può esporre a falsi negativi (39). Nel decorso della malattia allergica, soprattutto quando compaiono nuove sensibilizzazioni, è opportuno ripetere la valutazione degli SPT (40).

Il dosaggio delle IgE specifiche

Più dispendioso del test cutaneo, il dosaggio delle singole IgE specifiche nel siero non presenta migliori caratteristiche di performance. Per converso, l'uso di pannelli di IgE che, come il Phadiatop Infant, contengano gli allergeni rilevanti per quell'area geografica è stato dimostrato possedere un alto valore predittivo negativo nell'escludere la sensibilizzazione tra i bambini con respiro sibilante (41) e può pertanto essere usato come test di screening a livello generale (42). Più interessante mi pare il loro uso possibile nella predizione dell'asma del lattante. Infatti, anche se per ora non abbiamo nessuna dimostrazione che un trattamento precoce possa mutare la storia naturale dell'asma nel bambino, di fronte ad un lattante con asma difficilmente sfuggiremo alla domanda dei genitori "ma allora, sarà un asmatico per tutta la vita?" ed una risposta c'è, dal momento che l'asma inizia nell'età infantile.

Uso delle IgE per la predizione dell'asma

L'80% degli adulti con asma sviluppano la malattia in modo clinicamente rilevante nei loro primi cinque anni di vita (43), e almeno il 40% dei bambini

con bronchite sibilante prima del terzo anno di vita hanno ancora episodi di fischio a 6 anni (44). Un terzo dei lattanti con respiro sibilante restano degli asmatici, ed un altro terzo lo diventa nella seconda e terza decade di vita, dopo una guarigione apparente (45). Dunque le radici dell'asma si trovano nell'età pediatrica (46). Tra i fattori di rischio indicati dagli studi epidemiologici, accanto alla familiarità per asma, alle difficoltà psicosociali della famiglia, alla frequenza di infezioni respiratorie, al sesso femminile, la presenza di livelli elevati di IgE e la sensibilizzazione ad allergeni respiratori è indicata costantemente (47, 48). Benché tuttavia ciascuno di questi fattori sia associato con asma, il valore individuale di ciascun fattore resta poco predittivo della malattia (49). Infatti l'anamnesi familiare non è in grado di individuare con certezza quali bambini avranno asma (50, 51), così come la presenza di eczema atopico (52) o di iperreattività bronchiale (53). Di fatto, il singolo predittore migliore per la persistenza di asma tra i bambini con fischio è lo stato atopico (2): ciò non sorprende se si pensa che i livelli di IgE totali si mantengono con l'età (bambini con livelli di IgE elevati a 1 anno si mantengono tali a 6 ed 11 anni), mentre la sensibilizzazione precoce e un livello di IgE totali elevato a tutte le età è associato con la persistenza di fischio. L'asma tardivo o persistente si associa con elevati livelli di IgE già all'età di 9 mesi, e le IgE di bambini affetti da bronchiti asmatiche nel primo anno di vita che non svilupperanno asma non sono differenti da quelle di bambini senza fischio (54). Pertanto, per la predizione clinica dell'asma è necessario ricorrere ad algoritmi come quello proposto dal gruppo di Tucson (*Tabella 1*) (55), la cui efficienza è stata prospetticamente testata e può essere giudicata di qualche soddisfazione (56).

Tabella 1 L'algoritmo per il rischio d'asma. Uno dei primi due criteri maggiori + uno degli altri criteri maggiori oppure uno dei criteri minori. SDAE, sindrome dermatite atopica eczema.

| Criteri maggiori | Criteri minori |
|---|--|
| 1. Ricovero ospedaliero per accesso asmatico grave o bronchiolite | 1. Rinorrea senza raffreddore (il moccio!) |
| 2. Almeno tre bronchiti con sibilo nei precedenti 6 mesi | 2. Fischio senza infezione respiratoria |
| 3. Anamnesi d'asma tra i genitori | 3. Eosinofilia >5% |
| 4. SDAE | 4. Sesso maschile |

In uno studio di alcuni anni circa la predizione dello sviluppo di asma nel bambino tra 3 mesi e 3 anni, tra i vari marcatori immunologici indagati il più sensibile risultò il recettore solubile per l'IL-2 (sIL-2R) (51). La sua accuratezza, coniugata con la valutazione dell'età alla prima manifestazione d'asma, è in grado di predire lo sviluppo della malattia con una discreta predittività (VPP 76,47, VPN 68,25). In questo lavoro si considerano altri indici immunologici e clinici, dei quali i più associati con lo sviluppo d'asma sono la presenza di eczema, di SPT positivo, di elevati livelli di IgE, di genitori atopici. Nel tentativo di proporre una semplice formula di predizione, gli Autori propongono la seguente: età alla presentazione + sIL-2R. Tuttavia si direbbe ad una attenta lettura che la formula età + atopìa è quasi altrettanto valida. In altre parole, quanto più tardivo è l'esordio e quanto più allergico è il bambino, tanto più è probabile che si tratti di asma. Pertanto non stupisce se ad oggi il marker più investigato in questo senso è ancora il livello di IgE totali e specifiche.

Mentre il valore delle IgE totali cordonali nel predire la sensibilizzazione allergica precoce è buono, ma il loro valore predittivo sui sintomi respiratori o cutanei è scarso (57, 58), i livelli di IgE specifiche sono stati associati con lo sviluppo di asma e con la diagnosi di allergie. Una combinazione di allergeni inalanti ed alimentari, il Phadiatop Infant, è stata dimostrata in grado di identificare la condizione allergica come diagnosticata da un allergologo pediatra con una sensibilità, una specificità, un valore predittivo positivo e negativo del 92%, 82%, 80% e 93% rispettivamente. La sensibilità ed il valore predittivo negativo del test suggeriscono che esso possa essere usato come test di screening per i bambini con sintomi allergici, riducendo così il numero di procedure diagnostiche non necessarie; può inoltre essere usato come indicatore di malattia allergica e di asma (59). In senso più stretto un Phadiatop e/o RAST fx5 positivi (si tratta di due pannelli di allergeni, il primo per la valutazione della allergia ad inalanti e l'altro per quella ad alimenti) rappresentano un potente indice predittivo d'asma. In un gruppo di bambini sotto l'anno di vita ricoverati per bronchite asmatica, infatti, tutti i bambini positivi ad entrambi i test svilupparono asma entro i due anni, mentre nessuno di quelli che erano negativi ad entrambi i test sviluppò la malattia (60). Lo stesso vale per il solo Phadiatop nei bambini tra i due ed i quattro anni, ad indicare pertanto che l'esecuzione del Phadiatop e del RAST fx5 insieme ha

un buon valore predittivo, mentre il solo Phadiatop può indicare quali bambini svilupperanno la malattia tra quelli ricoverati a 2-4 anni. Questi pannelli sono, come detto, dedicati a due pattern di sensibilizzazione differenti. Il pannello del Phadiatop Infant li riunisce invece entrambi.

Conclusioni

La scoperta delle IgE e gli studi sul loro ruolo nell'asma sono tra i fattori che negli ultimi 30 anni hanno rivoluzionato l'approccio diagnostico, prognostico ed hanno ispirato l'approccio

terapeutico alla malattia. Giacché bambini asmatici e lattanti a rischio di sviluppare asma in seguito tendono ad avere alti livelli di IgE sieriche ed eosinofilia periferica con elevato ECP sierico, l'identificazione dello stato atopico è buon metodo di predizione dello sviluppo della malattia. Dal punto di vista diagnostico, lo studio dei marker di sensibilizzazione permette di seguire la progressione della malattia e quindi di fornire indicazioni per un intervento tempestivo. Pertanto, il test cutaneo ed il dosaggio delle IgE singole od in pannelli non può mancare nella gestione della malattia nel bambino.

Bibliografia

1. Nelson HS, Szefler SJ, Jacobs J, et al. *The relationships among environmental allergen sensitization, allergen exposure, pulmonary function, and bronchial hyperresponsiveness in the Childhood Asthma Management Program.* J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 775-785.
2. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, et al. *Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1282-1287.
3. Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, et al. *The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma.* N Engl J Med 1997; 336: 1356-1363.
4. Shirai T, Matsui T, Suzuki K, Chida K. *Effect of pet removal on pet allergic asthma.* Chest 2005; 127: 1565-1571.
5. Yssel H, Abbal C, Pène J, Bousquet J. *The role of IgE in asthma.* Clin Experim Allergy 1998; 28 (suppl 5): 104-109.
6. Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. *Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function.* Adv Immunol 2000; 76: 325-355
7. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. *The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals.* Cell 1996; 85: 985-995.
8. Finkelman FD, Urban JF Jr. *The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines.* J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 772-780.
9. Turner H, Kinet JP. *Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI.* Nature 1999; 402 (6760 Suppl): B24-30.
10. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. *T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases.* J Allergy Clin Immunol 2005; 116: 961-968.
11. Grayson MH. *Lung dendritic cells and the inflammatory response.* Ann Allergy Asthma Immunol 2006; 96: 643-651.
12. Ennis M, Turner G, Schock BC, et al. *Inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage samples from children with and without asthma.* Clin Exp Allergy 1999; 29: 362-366.
13. Pohunek P, Roche WR, Turzikova J, et al. *Eosinophilic inflammation in the bronchial mucosa of children with bronchial asthma.* Eur Respir J 1997; 19 (Suppl, 25): 160s.
14. Silvestri M, Oddera S, Spallarossa D, et al. *In childhood asthma the degree of allergen-induced T-lymphocyte proliferation is related to serum IgE levels and to blood eosinophilia.* Ann Allergy Asthma Immunol 2000; 84: 426-432.
15. Dolan CM, Reimann JD, Safrin S, Fick RB. *Serum IgE distributions in normal and asthmatic*

subjects. In: "IgE and anti-IgE therapy in asthma and allergic disease". New York, NY: Marcel Dekker Inc; 2002: 7-21.

16. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, et al. *Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens.* N Engl J Med 1989; 320: 271-277.
17. Vollmer WM, Buist AS, Johnson LR, et al. *Relationship between serum IgE and cross-sectional and longitudinal FEV1 in two cohort studies.* Chest 1986; 90: 416-23.
18. Kalyoncu AF, Stalenheim G. *Serum IgE levels and allergic spectra in immigrants to Sweden.* Allergy 1992; 47: 277-280.
19. Joseph CL, Ownby DR, Peterson EL, Johnson CC. *Racial differences in physiologic parameters related to asthma among middle-class children.* Chest 2000; 117: 1336-144.
20. Rackeman FM. *A working classification of asthma.* Am J Med 1947; 3: 601-606.
21. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, et al. *Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference?* Allergy 2002; 57: 607-613.
22. Martinez FD. *What have we learned from the Tucson Children's Respiratory Study?* Paediatr Respir Rev 2002; 3: 193-197.
23. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, et al. *High-affinity IgE receptor (FcεpsilonRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma.* Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 1931-1937.
24. Humbert M, Menz G, Ying S, et al. *The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences.* Immunol Today 1999; 20: 528-533.
25. Palmer LJ, Burton PR, Faux JA, et al. *Independent inheritance of serum immunoglobulin E concentrations and airway responsiveness.* Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1836-1843.
26. Lau S, Illi S, Platts-Mills TA, et al.; Multicentre Allergy Study Group. *Longitudinal study on the relationship between cat allergen and endotoxin exposure, sensitization, cat-specific IgG and development of asthma in childhood - report of the German Multicentre Allergy Study (MAS 90).* Allergy 2005; 60: 766-773.
27. Szeffler SJ, Phillips BR, Martinez FD, et al. *Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol 2005; 115: 233-242.
28. De Blay F. *Serum eosinophil cationic protein measurements in the management of perennial and periodic asthma: a prospective study.* Eur Respir J 1998; 11: 594-598.
29. Green RM, Custovic A, Sanderson G, et al. *Synergism between allergens and viruses and risk of hospital admission with asthma: case-control study.* BMJ 2002; 324: 763-766.
30. Wahn U, Lau S, Bergmann R, et al. *Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life.* J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 763-769.
31. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, et al. *Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study.* N Engl J Med 1990; 323: 502-507.
32. Boner AL, Bodini A, Piacentini GL. *Environmental allergens and childhood asthma.* Clin Exp Allergy 1998; 28 (Suppl 5): 76-81.
33. Nelson HS. *The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms.* J Allergy Clin Immunol 2000; 105: S628-632.
34. Liu AH. *Biomarkers and childhood asthma: improving control today and tomorrow.* Allergy Asthma Proc 2005; 26: 249-254.
35. Roberts G, Golder N, Lack G. *Bronchial challenges with aerosolized food in asthmatic, food-allergic children.* Allergy 2002; 57: 713-717.
36. NHLBI. *Global strategy for asthma management and prevention.* 2006. <http://www.ginasthma.com>
37. Chan EY, Dundas I, Bridge PD, et al. *Skin-prick testing as a diagnostic aid for childhood asthma.* Pediatr Pulmonol 2005; 39: 558-562.
38. Fiocchi A, Bouygue GR, Restani P, et al. *Accuracy of skin prick tests in bovine protein allergy (BPA).* Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 89: 26-32.
39. Olson R, Karpink MH, Shelanski S, et al. *Skin reactivity to codein and histamine during prolonged corticosteroid therapy.* J Allergy Clin Immunol 1990; 86: 153-159.

- 40.** Gustafsson D, Sjoberg O, Foucard T. Sensitization to food and airborne allergens in children with atopic dermatitis followed up to 7 years of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 448-452.
- 41.** Fiocchi A, Besana R, Ryden AC, et al. Differential diagnosis of IgE-mediated allergy in young children with wheezing or eczema symptoms using a single blood test. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93: 328-333.
- 42.** Fiocchi A, Bouygue GR, Terracciano L, et al. Ruling out food allergy in pediatrics and preventing the "march" of the allergic child. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27: 306-311.
- 43.** Rhodes HL, Thomas P, Sporik R, et al. A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 176-180.
- 44.** Wright AL, Taussig LM. Lessons from long-term cohort studies. *Childhood asthma*. *Eur Respir J* 1998; 27: 17s-22s.
- 45.** Sears MR, Greene JM, Willan AR, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349: 1414-1422.
- 46.** Fiocchi A, Terracciano L, Martelli A, et al. The natural history of childhood-onset asthma. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27: 178-185.
- 47.** Mrazek DA, Klinnert M, Mrazek PJ, et al. Prediction of early-onset asthma in genetically at-risk children. *Pediatr Pulmonol* 1999; 27: 85-94.
- 48.** Bosken CH, Hunt WC, Lambert WE, Samet JM. A parental history of asthma is a risk factor for wheezing and nonwheezing respiratory illnesses in infants younger than 18 months of age. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (6): 1810-1815.
- 49.** Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. *New Engl J Med* 1995; 332: 133-138.
- 50.** Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, et al. Predictability of early atopy by cord blood IgE and parental history. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 752-760.
- 51.** Clough JB, Keeping KA, Edwards LC, et al. Can we predict which wheezy infants will continue to wheeze? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1473-1480.
- 52.** Warner JO, for the ETAC Study ETAC study group. A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis: 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 929-937.
- 53.** Barbee RA, Murphy S. The natural history of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: S65-72.
- 54.** Sherrill DL, Stein R, Halonen M, et al. Total serum IgE and its association with asthma symptoms and allergic sensitization among children. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 28-36.
- 55.** Martinez FD. Recognizing early asthma. *Allergy* 1999; 54 (Suppl 49): 24-28.
- 56.** Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1403-1406.
- 57.** Edenharter G, Bergmann RL, Bergmann KE, et al. Cord blood IgE as risk factor and predictor for atopic diseases. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 671-678.
- 58.** Kaan A, Dimich-Ward H, Manfreda J, et al. Cord blood IgE: its determinants and prediction of development of asthma and other allergic disorders at 12 months. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 84: 37-42.
- 59.** Fiocchi A, Besana R, Rydén AC, et al. Clinical evaluation of phadiatop infant in the differential diagnosis of IgE-mediated allergy in young children with wheezing or/and eczema symptoms. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 116.
- 60.** Wever-Hess J, Kouwenberg JM, Duiverman EJ, et al. Prognostic characteristics of asthma diagnosis in early childhood in clinical practice. *Acta Paediatr* 1999; 88: 827-834.

Chiara Stenghele, Deborah Snijders, Cristina Panizzolo*, Angelo Barbatò

Dipartimento di Pediatria, Università di Padova; * Dipartimento di Pediatria, Ospedale di Vicenza

Ruolo del BAL e della biopsia bronchiale nella caratterizzazione dell'infiammazione delle vie aeree inferiori nell'asma bronchiale infantile

The role of BAL and bronchial biopsy in the characterization of lower airway inflammation in childhood asthma

Parole chiave: asma, broncoscopia, lavaggio broncoalveolare, biopsia bronchiale

Key words: asthma, bronchoscopy, bronchoalveolar lavage, bronchial biopsy

Riassunto. Numerose sono le ricerche in cui vengono valutati i fenomeni infiammatori a carico delle vie aeree inferiori nei bambini asmatici: alcuni metodi sono meno invasivi, come lo sputo indotto e la misurazione di gas nell'aria espirata (CO, NO) o la misurazione di marker di stress ossidativo nel condensato dell'aria espirata, altri sono più invasivi come il lavaggio broncoalveolare (BAL) e le biopsie bronchiali. Eseguendo il BAL nei bambini con asma bronchiale e nei lattanti con respiro sibilante è stata dimostrata la presenza di un'elevata percentuale di eosinofili nei primi e di neutrofili nei secondi; in entrambi i casi è stata riscontrata anche un'elevata percentuale di cellule epiteliali che suggeriscono uno sfaldamento dell'epitelio bronchiale. Sottoponendo a biopsia bronchiale bambini con asma è stato dimostrato che esiste un rimodellamento della parete bronchiale con ispessimento della membrana basale, aumento del numero di vasi e aumento degli eosinofili nella parete bronchiale e sfaldamento dell'epitelio bronchiale, come osservato negli adulti asmatici.

Ulteriori studi sono necessari per meglio definire i diversi fenotipi di asma bronchiale infantile.

Accettato per la pubblicazione il 7 dicembre 2006.

Corrispondenza: Dott.ssa Chiara Stenghele, Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova; e-mail: chiara.stenghele@email.it

Introduzione

L'asma è la malattia infiammatoria cronica delle vie aeree più frequente del bambino, ed è caratterizzata da contrazione della muscolatura liscia bronchiale, edema della parete bronchiale, e ipersecrezione (1, 2).

Vari studi su coorti longitudinali hanno dimostrato che in più del 25% dei casi la malattia, che inizia nell'età infantile, si protrae nell'età adulta anche per effetto di alcuni fattori di rischio come il fumo di sigarette e l'allergia agli acari (3-6).

Tecniche non invasive di studio dell'infiammazione delle vie aeree

Numerose sono le ricerche in cui vengono valutati i fenomeni infiammatori a carico delle vie aeree inferiori nei bambini asmatici: alcuni metodi sono meno invasivi come lo sputo indotto e la misurazione di gas nell'aria espirata (CO, NO) o la misurazione di marker di stress ossidativo nel condensato dell'aria espirata, altri sono più invasivi come il lavaggio broncoalveolare (BAL) e le biopsie bronchiali. Nello sputo indotto la risposta infiammatoria nel

bambino asmatico-allergico è caratterizzata da un elevato numero di eosinofili e da elevata concentrazione di proteina cationica degli eosinofili (7). Studi sull'aria espirata hanno dimostrato che l'ossido nitrico è più elevato nei bambini asmatici rispetto a controlli sani. La correlazione tra produzione di ossido nitrico (NO) e l'infiammazione delle vie aeree, soprattutto da eosinofili, appare evidente e la misurazione dei livelli di NO espirato (FE_{NO}) potrebbe essere particolarmente utile per verificare lo stato di infiammazione delle vie aeree nei bambini e potrebbe essere di complemento ad altre indagini come la spirometria e lo sputo indotto, a volte di difficile esecuzione nel bambino soprattutto in età prescolare (7-9).

L'interesse nella ricerca di marcatori di infiammazione presenti nell'aria espirata di soggetti asmatici è sempre molto elevato tra i ricercatori anche nella speranza di trovare un indice predittivo di asma e di gravità della malattia: è stata recentemente dimostrata nel condensato espirato una elevata concentrazione di perossido di idrogeno (10), un aumento dell'interleuchina-4, un decremento dell'interferon-gamma (11), e un incremento dei leucotrieni (12). Un altro studio recente ha dimostrato nei bambini asmatici un alterato rapporto nel condensato dell'aria espirata tra sostanze ossidanti e antiossidanti durante la crisi accessuale, e la loro modificazione dopo una settimana di terapia steroidea (13).

Tecniche invasive di studio dell'infiammazione delle vie aeree

Il BAL è una tecnica ormai ben codificata, che viene eseguita normalmente nel corso delle broncoscopie cui vengono sottoposti i bambini sulla base di indicazioni ben definite. Il BAL permette infatti di raccogliere tutta una serie di informazioni relative alla citologia bronco-polmonare, alla produzione "profonda" di mediatori e alla presenza di agenti infettanti (14).

Eseguito il BAL nei bambini con asma bronchiale e nei lattanti con respiro sibilante è stata dimostrata la presenza di un'elevata percentuale di eosinofili nei primi e di neutrofilii nei secondi; in entrambi i casi è stata riscontrata anche un'elevata percentuale di cellule epiteliali che suggerivano una sfaldamento dell'epitelio bronchiale (15). In un altro studio è stata rilevata un'evidente attivazione di neutrofilii anche in corso di asma persistente

lieve-moderata rispetto ai pazienti con asma intermittente, dimostrando che l'infiammazione mediata dai neutrofilii è più significativa in pazienti con asma più grave (16).

Studi condotti su biopsie bronchiali hanno permesso di dimostrare la precocità della flogosi cronica e i suoi effetti sulle vie aeree del bambino (17), che si sono dimostrati molto simili a quanto già descritto nell'adulto (18).

In uno studio di Payne fatto su 23 bambini con asma difficile, cioè poco responsiva agli steroidi inalati ad alte dosi, prima e due settimane dopo trattamento con prednisolone orale si potevano evidenziare almeno 2 gruppi di asmatici: quelli con valori normali di NO nell'aria espirata prima e dopo la somministrazione di steroide orale e quelli con NO persistentemente elevato prima e dopo la terapia steroidea (19). Si capisce quindi l'importanza di sottoporre questi pazienti a BAL e biopsia bronchiale per meglio chiarire questi diversi fenotipi della malattia. Lo stesso gruppo di autori, quindi, sottoponendo a biopsia bronchiale questi pazienti con asma difficile ha dimostrato che esiste un rimodellamento della parete bronchiale con ispessimento della membrana basale (20). Questo reperto risultava simile a quello descritto nell'adulto, sia con asma lieve che con asma grave, senza correlazione dimostrabile tra l'entità dell'ispessimento e la durata della malattia, il FE_{NO} , e l'entità della infiammazione eosinofila della mucosa.

Un recente lavoro di Saglani et al. ha dimostrato che in bambini di età inferiore a 26 mesi con episodi di respiro sibilante ricorrente e/o tosse, la presenza di ostruzione reversibile delle vie aeree si sviluppa anche senza un dimostrabile ispessimento della membrana basale e una infiammazione eosinofila, pur in presenza di atopia (21). Questo studio, anche se fatto in una popolazione di bambini non sicuramente asmatici, ma che potrebbero rientrare tra i pazienti che presentano nei primi 3 anni di vita respiro sibilante precoce o transitorio, dimostra come le nostre conoscenze sul rimodellamento siano ancora lontane da una precisa definizione della sequenza degli eventi che interessano le vie aeree nell'asma bronchiale infantile e come esistano diversi fenotipi di asma nel bambino che necessitano di ulteriori indagini per essere precisamente individuati.

Un altro contributo alla definizione degli eventi infiammatori che interessano la parete bronchiale

nel bambino asmatico viene dal nostro gruppo che ha valutato l'angiogenesi e il danno epiteliale nella parete bronchiale dei bambini asmatici. In questo lavoro abbiamo dimostrato in bambini di età variabile da 1 a 15 anni come lo sfaldamento dell'epitelio bronchiale e l'ispessimento della membrana basale, il numero di vasi e gli eosinofili nella parete bronchiale siano aumentati negli asmatici rispetto ai controlli e come questo fenomeno sia più marcato nei bambini sotto i 6 anni di età (22).

Due fenotipi di asma grave dell'adulto erano stati descritti anche dalla Wenzel: uno costituito da pazienti con biopsia positiva per presenza di eosinofili nella sottomucosa e uno costituito da pazienti con biopsia negativa per tali cellule. È stata valutata in questi pazienti anche l'espressione del TGF- β nelle cellule epiteliali (18). Il TGF- β è una citochina che può promuovere la deposizione della matrice extracellulare sottoepiteliale e inibire nel contempo la sua degradazione, contribuendo così ad un'estesa deposizione di tale matrice che è caratteristica della infiammazione allergica cronica nell'adulto (23). Le cellule epiteliali che esprimono il TGF- β risultavano nello studio della Wenzel significativamente più numerose nel gruppo positivo per eosinofili che non nell'altro gruppo. I soggetti con eosinofili negativi che erano risultati con una membrana basale meno spessa degli altri, presentavano un FEV₁ più basso (18).

In un nostro recente studio su biopsie bronchiali di bambini asmatici e di atopici non asmatici abbiamo rilevato una eosinofilia e un ispessimento della membrana basale sia in bambini con asma lieve sia in quelli con asma moderata, ma anche in bambini atopici non asmatici. Inoltre nei bambini con asma, ma non negli atopici senza asma, abbiamo rilevato una "downregulation" di un recettore del TGF- β (il TGF β -RII) (17).

Studi in vitro su cellule epiteliali monostratificate, tratte da biopsie di soggetti asmatici, danneggiate chimicamente hanno dimostrato la liberazione di fattori fibroproliferativi e profibrotici come il "fibroblast growth factor" (FGF-2), l'"insulin growth factor" (IGF-1), il "platelet-derived growth factor" (PDGF), l'Endotelina (ET-1) e il "trasforming-growth factor" (TGF- β 2) (24). Altri studi sperimentali hanno dimostrato che bloccando l'Epithelial Growth Factor (EGF) veniva causato un ritardo nella riparazione del danno epiteliale e a un aumento di espressione di TGF- β da

parte delle cellule epiteliali, che risultava poco sensibile alla terapia steroidea (25).

Alcuni Autori hanno sostenuto che il danno epiteliale osservato nelle biopsie della mucosa bronchiale degli asmatici possa essere più un artefatto che una vera alterazione istologica (26); ma dati relativi a una aumentata espressione da parte delle cellule epiteliali del recettore per EGF (EGFR) nelle biopsie bronchiali di soggetti asmatici dimostrano invece come il danno epiteliale si verifichi anche in vivo (25). L'aumentata espressione dell'EGFR è risultata non sensibile allo steroide ed è correlata positivamente con la gravità della malattia. L'EGF accelera la riparazione delle cellule danneggiate, mentre il blocco del EGFR con un inibitore selettivo aumenta significativamente la quantità di TGF- β 2 (25). Le cellule apoptotiche, presenti anche nell'asmatico per effetto dello stress ossidativo, forniscono TGF- β che induce i fibroblasti della membrana reticolare a proliferare e trasformarsi in miofibroblasti che sono grandi produttori di fibrille collagene. Se il processo continua, il "remodeling" progredisce, in caso contrario si ipotizza una minore produzione di TGF- β e una evoluzione verso la risoluzione della fibrosi a mano a mano che l'integrità dell'epitelio viene restaurata (27). Infatti le cellule apoptotiche nelle ferite cutanee lievi vengono rimosse in vivo con minima reazione locale. Questo sembra essere il risultato di un'attiva produzione di mediatori antiinfiammatori, particolarmente TGF- β e prostanoidei antiinfiammatori (28, 29). Se invece il danno epiteliale è più esteso, allora vi sarebbe una maggiore e incontrollabile produzione di TGF- β che favorisce il processo di *remodeling*. Quindi il TGF- β avrebbe due tipi di funzione a seconda dell'entità dello stimolo: una funzione antiinfiammatoria o una funzione profibrotica.

L'infiammazione di tipo Th-2 è una caratteristica dell'asma, indipendentemente dall'atopia. Alcuni mediatori da essa prodotti sono stati oggetto di recenti ricerche. È stato così dimostrato che colture di cellule bronchiali di asmatici rispondono alla IL-4 e IL-13 con una aumentata fosforilazione di STAT-6 (30) accompagnata da aumentata produzione di GM-CSF, IL-8, e TNF- α che risultano ulteriormente aumentati stimolando le cellule con estratti di Der p (31). Il TNF- α è un importante ligando dell'EGFR, riducendo quindi il suo effetto riparatore e favorendo così il *remodeling*.

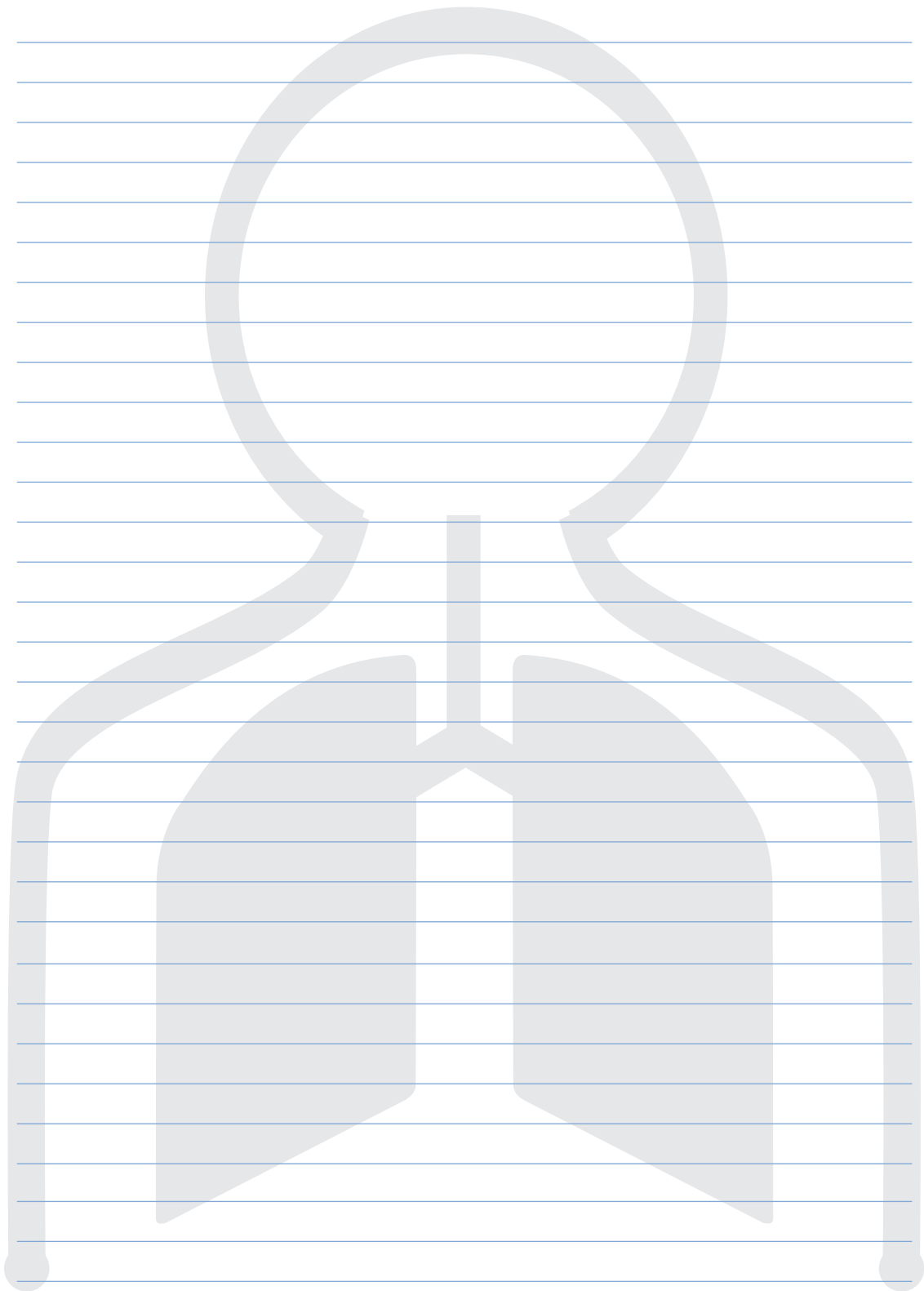
IL-4 e IL-13 derivate dalla reazione infiammatoria allergica promuovono anche la liberazione di TGF- β da parte delle cellule epiteliali e quindi la trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti (32). In conclusione due sono i meccanismi che al momento attuale sono stati studiati per spiegare il *remodeling* osservato negli asmatici: uno legato al danno cellulare e ai meccanismi infiammatori ad esso correlati; l'altro alla reazione di tipo Th2, che

è caratteristica dell'asma, e che si manifesta con la produzione di citochine alcune delle quali ad effetto profibrotico. Nel processo di rimodellamento dell'asma esiste dunque il concorso di più fattori: fattori genetici e fattori proinfiammatori ambientali che insieme concorrono alla definizione istopatologica della malattia e che possono essere adeguatamente studiati con il BAL e la biopsia bronchiale.

Bibliografia

1. National Heart, Lung, and Blood Institute. *Global strategy for asthma management and prevention*. National Institute of Health Pub No 02-3659; 2002.
2. *British guideline on the management of asthma*. Thorax 2003; 58: i1-i94.
3. Strachan DP, Butland BK, Anderson HR. *Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort*. BMJ 1996; 312: 1195-1199.
4. Strachan DP, Anderson HR, Bland JM, Peckham C. *Asthma as a link between chest illness in childhood and chronic cough and phlegm in young adults*. BMJ 1988; 296: 890-893.
5. Kelly WJ, Hudson I, Phelan PD, et al. *Childhood asthma in adult life: a further study at 28 years of age*. BMJ 1987; 294: 1059-1062.
6. Sears MR, Greene JM, Wiecek EM, et al. *A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood*. N Engl J Med 2003; 349: 1414-1422.
7. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. *Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate*. Eur Respir J 2000; 16: 1008-1015.
8. Baraldi E, de Jongste JC. *Measurement of exhaled nitric oxide in children*. 2001 ERS/ATS statement. Eur Respir J 2002; 20: 223-237.
9. Formanek W, Inci D, Leuener RP, et al. *Elevated nitrite in breath condensate of children with respiratory disease*. Eur Respir J 2002; 19: 487-491.
10. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, et al. *Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients*. Chest 2001; 120: 1136-1139.
11. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. *Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 1290-1293.
12. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, et al. *Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166: 1345-1349.
13. Corradi M, Folesani G, Andreoli R, et al. *Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation*. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 395-399.
14. de Blic J, Midulla F, Barbato A, et al. *Bronchoalveolar lavage in children*. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. Eur Respir J 2000; 15: 217-231.
15. Marguet C, Jouen-Bodes F, Dean TP, Warner JO. *Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1533-1540.
16. Barbato A, Panizzolo C, Gheno M, et al. *Bronchoalveolar lavage in asthmatic children: evidence of neutrophil activation in mild-to-moderate persistent asthma*. Pediatr Allergy Immunol 2001; 12: 73-77.
17. Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al. *Airway inflammation in childhood asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168: 1-6.
18. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. *Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics*. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1001-1008.
19. Payne DN, Wilson NM, James A, et al. *Evidence for different subgroups of difficult asthma in children*. Thorax 2001; 56: 345-350.
20. Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, et al. *Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 78-82.
21. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, et al. *Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction*. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 722-727.
22. Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al. *Epithelial Damage and Angiogenesis in the Airways of Children with Asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 975-981.
23. O'Connor CM, Fitzgerald MX. *Matrix metalloproteases and lung*. Thorax 1994; 49: 602-609.

- 24.** Zhang S, Smartt H, Holgate ST, Roche WR. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an *in vitro* co-culture model of airway remodelling in asthma. *Lab Invest* 1999; 79: 395-405.
- 25.** Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 2000; 14: 1362-1374.
- 26.** Ordonez C, Ferrando nR, Hyde DM, et al. Epithelial desquamation in asthma. Artifact or pathology? *Am J Respir Critic Care Med* 2000; 162: 2324-2329.
- 27.** Henson PM. Possible roles for apoptosis and apoptotic cell recognition in inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: s70-s76.
- 28.** Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-898.
- 29.** Huynh M, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002; 109: 41-50.
- 30.** Mullings RE, Wilson SI, Djukanovich R, et al. Increased STAT6 expression in bronchial epithelium of severe asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 832-838.
- 31.** Lordan JL, Bucchieri F, Richter A, et al. Co-operative effects of Th-2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2002; 169: 407-414.
- 32.** Richter A, Puddicombe SM, Lordan J, et al. The contribution of interleukin (IL) 4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 385-391.



Congressi

Congresses

GENNAIO 2007

Vaccini e vaccinazioni

Il congresso nazionale

Roma 26 - 27 gennaio 2007

Segreteria organizzativa:

Gestifimp s.r.l.

Tel. 0744.305752

Cell. 339.6934166

E-mail: valeria.tricarico@gestifimp.org

FEBBRAIO 2007

Rinosinusite e patologie associate in età pediatrica

Milano 2 - 3 febbraio 2007

Segreteria organizzativa:

MCA Events s.r.l.

Tel. 02.34934404

Fax 02.34934397

E-mail: info@mcaevents.org

www.mcaevents.org

XXIX Congresso Europeo Giornate Pediatriche Invernali

Madonna di Campiglio (TN) 5 - 9 febbraio 2007

Segreteria organizzativa:

www.giornatepediatricheinvernali.it

MARZO 2007

Sirmione 2007

III Congresso Nazionale di Pediatria on-line

Sirmione 22 - 24 marzo 2007

Segreteria organizzativa:

I.C.P. s.r.l.

Tel/Fax 030.5032090

E-mail: segreteria@pediatria.it

www.pediatria.it/sirmione2007

IX Congresso Nazionale di Allergologia e Immunologia Pediatrica

Firenze 29 - 31 marzo 2007

Segreteria organizzativa:

Eventi Moderni

Tel. 339.2718972

DICEMBRE 2007

XXXIX Congresso Nazionale AIPO (Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri)

VIII Congresso Nazionale UIP (Unione Italiana per la Pneumologia)

Firenze 4 - 7 dicembre 2007

Segreteria Organizzativa:

iDea congress

Tel. +39 06.36381573

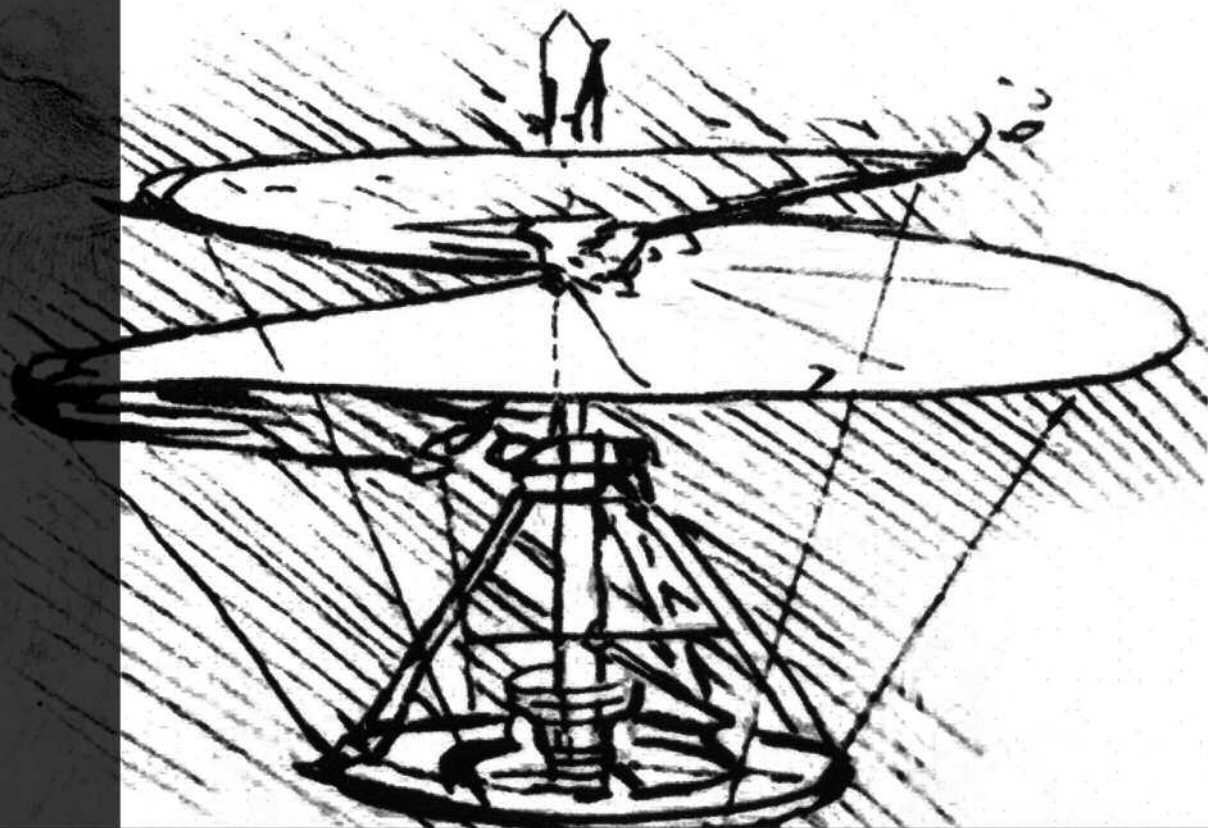
Fax +39 06.36307682

[Per la locandina si veda la pagina successiva](#)

XXXIX  CONGRESSO
NAZIONALE
AIPO ASSOCIAZIONE ITALIANA
PNEUMOLOGICI OSPEDALIERI

VIII  CONGRESSO
NAZIONALE
UIP UNIONE ITALIANA
PER LA PNEUMOLOGIA

MALATTIE RESPIRATORIE: EMERGENZA SOCIALE. LE RISPOSTE DELLA PNEUMOLOGIA



4 - 7 Dicembre 2007
Fortezza da Basso - Firenze

Segreteria Organizzativa



iDea congress
Via della Farnesina, 224
00194 Roma
Tel. +39 06 36381573
Fax +39 06 36307682

In collaborazione con

A I P O RICERCHE 
Società a Responsabilità Limitata a Capitale Instrumento APC

 aiponet
www.aiponet.it

E-mail: aipo2007@aiporicerche.it

Sommario Volume 6

Volume n°6 Summary

Numero 21

La prevenzione delle infezioni respiratorie

Le vaccinazioni nel bambino allergico e in quello con pneumopatia cronica: quello che il pediatra deve sapere

Vaccinations in allergic children and in those with chronic lung disease: what the pediatrician should know

F. Lippi, C. Massai, G. Colarusso, R. Bernardini, C. Azzari

Gli immunostimolanti: utili o inutili?

Immunostimulants: useful or useless?

M. Duse

La vaccinazione antipertosse tra vecchie conoscenze e nuove aspettative

Vaccinations against pertussis: ancient notions and new expectations

S. Scivales, O. Cipolla, A. E. Tozzi

La vaccinazione antinfluenzale nei bambini con malattia respiratoria

Influenza vaccination in children affected by respiratory diseases

G. Fenu, G. Paci, L. Boselli, M. Baldini

Influenza aviaria: aspetti zoonotici e rischi per la salute umana

Avian flu: zoonotic features and risks for human health

I. Monne, L. Busani, I. Capua

Vaccinazione antipneumococcica nei bambini sani e in quelli a rischio

Antipneumococcal vaccination in healthy children and in those at risk

F. D'Ancona, F. R. Meduri, S. Parrocchini, M. L. Ciofi degli Atti

RUBRICA: PER IMPARARE

La terapia inalatoria: aspetti pratici

Practical aspects of aerosol therapy

A. Battistini, R. Marvasi

Numero 22

Prove di funzionalità respiratoria in età pediatrica

Lo studio della funzionalità respiratoria nei primi due anni di vita

Lung function tests during the first two years of life

A. Dotta, F. Calzolari, A. Turchetta, R. Cutrera, E. Lombardi

Lo studio della funzionalità respiratoria in età prescolare

Lung functions testing in preschool children

E. Lombardi, A. Boccaccino, D. Peroni, G. Tancredi, A. Turchetta, R. Cutrera, M. Verini

La spirometria nel bambino collaborante

Spirometry in cooperating children

S. La Grutta

I volumi polmonari statici nella valutazione della funzionalità respiratoria nel bambino collaborante

Pulmonary static volumes in respiratory function evaluation of cooperating children

M. Verini, E. Lombardi, A. Nicodemo, C. Spagnolo

La responsività bronchiale farmacologica

Pharmacological bronchial responsivity

M. Verini, A. Nicodemo, A. D'Arcangelo, S. Di Pillo, E. Lombardi

Le prove da sforzo

Exercise tests

G. Tancredi, A. Turchetta

Numero 23

Novità in tema di...

Novità in tema di endoscopia bronchiale ed emergenze respiratorie

Update on bronchial endoscopy and respiratory emergency

Novità in tema di educazione sanitaria nell'asma

Asthma education: are there any news?

Novità in tema di disturbi respiratori nel sonno

News about sleep-disordered breathing

Novità in tema di allergologia: prevenzione dell'asma e dell'allergia

Update on allergy: prevention of asthma and allergic diseases

Novità in tema di riabilitazione respiratoria del bambino

News in pulmonary rehabilitation of the child

Novità in tema di polmone suppurativo: il polmone suppurativo non fibrocistico

News on suppurative lung diseases: non-cystic fibrosis suppurative lung

CASI CLINICI

Un caso di asma intrattabile

Difficult asthma: a case report

Numero 24

Studio e monitoraggio dell'infiammazione delle vie aeree

La misura dell'ossido nitrico nella pratica clinica

Nitric oxide measurement in clinical practice

G. Bonetto, G. Gottardi, S. Donegà, S. Carraro, S. Zanconato, E. Baraldi

Il condensato dell'aria espirata in pneumologia pediatrica

Exhaled breath condensate in paediatric pulmonology

M. Corradi

La metodica dell'espettorato indotto

The method of induced sputum

E. Milanese, R. Pigozzi, G. Piacentini

Ruolo dei biomarker nel sangue periferico nella valutazione dell'infiammazione e del controllo dell'asma nel bambino

Role of peripheral blood biomarkers related to airway inflammation and monitoring of childhood asthma

S. La Grutta

Il ruolo delle IgE nell'asma

The role of IgE in asthma

A. Fiocchi, L. Terracciano, A. Martelli, T. Sarratù

Ruolo del BAL e della biopsia bronchiale nella caratterizzazione dell'infiammazione delle vie aeree inferiori nell'asma bronchiale infantile

The role of BAL and bronchial biopsy in the characterization of lower airway inflammation in childhood asthma

C. Stenghele, D. Snijders, C. Panizzolo, A. Barbato

Indice degli Autori

Authors Index

- Armenio L**
n.23, 32
- Azzari C**
n.21, 3
- Baldini M**
n.21, 27
- Baraldi E**
n.24, 5
- Barbato A**
n.24, 11, 49
- Barberio G**
n.23, 39
- Battistini A**
n.21, 51
- Benfatto I**
n.23, 56
- Bernardini R**
n.21, 3
- Boccaccino A**
n.22, 16
- Bonetto G**
n.24, 5
- Boselli L**
n.21, 27
- Brunese F P**
n.23, 51
- Brunetti L**
n.23, 20, 22, 32
- Bucci N**
n.23, 25
- Busani L**
n.21, 34
- Cafagna R**
n.23, 22
- Calzolari F**
n.22, 6
- Caminiti L**
n.23, 39
- Campa M**
n.23, 22
- Canciani M**
n.23, 56
- Capra L**
n.23, 14
- Capua I**
n.21, 34
- Carraro S**
n.24, 5
- Cavallo L**
n.23, 25
- Chiarini Testa M B**
n.23, 64
- Cicchetti R**
n.23, 7
- Ciofetta G**
n.23, 64
- Ciofi degli Atti M L**
n.21, 43
- Cipolla O**
n.21, 18
- Colarusso G**
n.21, 3
- Corradi M**
n.24, 12
- Cutrera R**
n.22, 6, 16; n.23, 64
- D'Ancona F**
n.21, 43
- D'Arcangelo A**
n.22, 53
- De Sario V**
n.23, 32
- Di Pillo S**
n.22, 53
- Donegà S**
n.24, 5
- Dotta A**
n.22, 6
- Duse M**
n.21, 10
- Fenu G**
n.21, 27
- Fico S**
n.23, 25
- Fiocchi A**
n.24, 41
- Fiore F**
n.23, 32
- Francavilla R**
n.23, 25
- Gizzi C**
n.23, 7
- Gottardi G**
n.24, 5
- Indinnimeo L**
n.23, 14
- La Grutta S**
n.22, 33; n.24, 28
- Leone G**
n.23, 25
- Lieggi S**
n.23, 22
- Lippi F**
n.21, 3
- Lippolis P**
n.23, 22
- Lombardi E**
n.22, 6, 16, 42, 53

- Lorè M**
n.23, 32
- Lospalluti M L**
n.23, 32
- Magistà A M**
n.23, 25
- Manganaro M**
n.23, 7
- Manganozzi L**
n.23, 7
- Marseglia G**
n.23, 39
- Martelli A**
n.24, 41
- Marvasi R**
n.21, 51
- Massai C**
n.21, 3
- Matrunola M**
n.23, 7
- Meduri F R**
n.21, 43
- Midulla F**
n.23, 7
- Milanesi E**
n.24, 20
- Miniello V L**
n.23, 22
- Miraglia del Giudice M**
n.23, 51
- Monne I**
n.21, 34
- Moretti C**
n.23, 7
- Nespoli L**
n.23, 29
- Nicodemo A**
n.22, 42, 53
- Nosetti L**
n.23, 29
- Orazi C**
n.23, 64
- Paci G**
n.21, 27
- Pagani J**
n.23, 35
- Pajno G**
n.23, 39
- Panizzolo C**
n.24, 49
- Papoff P**
n.23, 7
- Parrocchini S**
n.21, 43
- Pavone S**
n.23, 22
- Peroni D**
n.22, 16
- Petreschi F**
n.23, 64
- Piacentini G**
n.24, 20
- Pigozzi R**
n.24, 20
- Prokopiou E**
n.23, 22
- Rizzi D**
n.23, 25
- Salerno T**
n.23, 64
- Sarratud T**
n.24, 41
- Scivales S**
n.21, 18
- Snijders D**
n.24, 49
- Spagnolo C**
n.22, 42
- Spica Russotto V**
n.23, 29
- Stenghele C**
n.24, 49
- Tancredi G**
n.22, 16, 65; n.23, 45
- Tedeschi G**
n.23, 32
- Terracciano L**
n.24, 41
- Tozzi A E**
n.21, 18
- Tromba V**
n.23, 7
- Turchetta A**
n.22, 6, 16, 65; n.23, 49
- Valeri M**
n.23, 56
- Varricchio A**
n.23, 51
- Verini M**
n.22, 16, 42, 53
- Villa M P**
n.23, 35
- Vita D**
n.23, 39
- Zanconato S**
n.24, 5
- Zuffo S**
n.23, 46

Indice delle parole chiave

Key words Index

ADHD **n.23**, 20
(ADHD)

Aerosol **n.21**, 51
(aerosol)

Allergia **n.21**, 3; **n.23**, 39; **n.24**, 41
(allergy)

ALTE **n.23**, 20
(ALTE)

Antibiotico-resistenza **n.21**, 43
(antimicrobial resistance)

Aria esalata **n.24**, 12
(exhaled air)

Asma **n.21**, 27; **n.22**, 33; **n.23**, 14, 39, 64; **n.24**, 5, 20, 41, 49
(asthma)

atopico **n.24**, 28
(atopic asthma)

Bambini **n.22**, 16; **n.23**, 7, 14
(children)

Biopsia bronchiale **n.24**, 49
(bronchial biopsy)

Bronchiectasie non fibrocistiche **n.23**, 56
(non-cystic fibrosis bronchiectasis)

Broncopneumopatia cronica ostruttiva **n.21**, 3
(chronic obstructive pulmonary disease)

Broncoscopia **n.23**, 64; **n.24**, 49
(bronchoscopy)

Capacità funzionale residua **n.22**, 6
(functional residual capacity)

Cellule T **n.24**, 28
(Tcell)

Ciglia **n.23**, 56
(cilia)

Citochine **n.24**, 28
(cytokine)

Compressione rapida toraco-addominale **n.22**, 6
(rapid thoraco-abdominal compression)

Condensato **n.24**, 12
(condensate)

Correlazioni **n.24**, 28
(correlation)

Discinesia ciliare primitiva **n.23**, 56
(primary ciliary dyskinesia)

Distanziatore **n.21**, 51
(spacer)

Disturbi respiratori nel sonno **n.23**, 20
(sleep-disordered breathing)

Educazione **n.23**, 14
(education)

Endoscopia virtuale delle vie aeree **n.23**, 7
(virtual endoscopy of respiratory airways)

Espettorato indotto **n.24**, 20
(induced sputum)

Età prescolare **n.22**, 16
(preschool)

Eziologia **n.23**, 56
(aetiology)

Fisiopatologia respiratoria **n.22**, 33
(pulmonary physiopathology)

Fisioterapia respiratoria **n.23**, 45
(chest physiotherapy)

Funzionalità polmonare **n.22**, 16
(lung function)

Gas mixing **n.22**, 16
(multiple breath wash-out)

IgE **n.24**, 41
(IgE)

Immunostimolanti **n.21**, 10
(immunostimulants)

Immunoterapia **n.23**, 39
(immunotherapy)

Impedenziometria intraluminale multicanale **n.23**, 20
(multichannel intraluminal impedante)

Infezioni respiratorie ricorrenti **n.21**, 10
(recurrent respiratory infections)

- Inflamazione n.24**, 12, 20
(*Inflammation*)
- delle vie aeree **n.24**, 5, 28
(*airway inflammation*)
- Influenza n.21**, 3; 27
(*influenza*)
- aviaria **n.21**, 34
(*avian flu*)
- Inquinamento n.24**, 28
(*pollution*)
- Insufficienza respiratoria n.23**, 7
(*respiratory insufficiency*)
- Interruzione n.22**, 16
(*interrupter technique*)
- Iperreattività bronchiale (IRB) n.22**, 53
(*bronchial hyperreactivity [BHR]*)
- Lavaggio broncoalveolare n.24**, 49
(*bronchoalveolar lavage*)
- Malattia invasiva da pneumococco n.21**, 43
(*invasive pneumococcal disease*)
- Malattie respiratorie croniche n.21**, 27
(*chronic respiratory diseases*)
- Marker n.24**, 28
(*markers*)
- Metered dose inhaler n.21**, 51
(*metered dose inhaler*)
- Monitoraggio domiciliare n.23**, 20
(*home monitoring*)
- Oscillazioni forzate n.22**, 16
(*forced oscillations*)
- Ossido nitrico n.24**, 5
(*nitric oxide*)
- esalato **n.24**, 28
(*exhaled nitric oxide*)
- Patologia respiratoria cronica n.23**, 45
(*chronic lung disease*)
- Pertosse n.21**, 18
(*pertussis*)
- Pletismografia corporea n.22**, 42
(*plethysmography*)
- Prevenzione n.23**, 39
(*prevention*)
- Provocazione bronchiale n.22**, 16
(*challenge tests*)
- Reflusso gastroesofageo (RGE) n.23**, 64
(*gastroesophageal reflux [GER]*)
- Resistenze specifiche n.22**, 16
(*specific airway resistance*)
- Salute umana n.21**, 34
(*human health*)
- Sangue periferico n.24**, 28
(*peripheral blood*)
- Scintigrafia ventilatoria n.23**, 64
(*lung scan*)
- Scuola n.23**, 14
(*school*)
- SIDS n.23**, 20
(*SIDS*)
- Sindrome delle apnee ostruttive nel sonno (OSAS) n.23**, 64
(*obstructive sleep apnea syndrome [OSAS]*)
- Spirometria n.22**, 16, 33
(*spirometry*)
- Strategie preventive n.21**, 18
(*preventive strategies*)
- Streptococcus pneumoniae n.21**, 3, 43
(*streptococcus pneumoniae*)
- Stress ossidativo n.24**, 12
(*oxidative stress*)
- Tecnica della diluizione dei gas n.22**, 42
(*dilution technique*)
- Terapia inalatoria n.23**, 45
(*inhalation therapy*)
- Test alla metacolina (MCh Test) n.22**, 53
(*metacholine challenge test [MCh Test]*)
- Test da sforzo n.23**, 45
(*exercise test*)

- cardiopulmonare **n.22**, 65
(cardiopulmonary exercise test)
- Test del cammino di sei minuti **n.22**, 65
(six minutewalking test)
- Test del gradino **n.22**, 65
(step test)
- Test di broncodilatazione (TBD) **n.22**, 53
(bronchodilation test [BDT])
- Test di funzionalità respiratoria nel lattante **n.22**, 6
(infant lung function tests)
- Test di provocazione bronchiale (TPB) **n.22**, 53
(bronchial provocation tests [BPT])
- Trattamento **n.23**, 56
(treatment)
- Vaccinazione **n.21**, 18
(vaccination)
- antinfluenzale **n.21**, 27
(influenza vaccination)
- pneumococcica **n.21**, 43
(pneumococcal vaccine)
- Vaccino **n.21**, 3
(vaccine)
- Valutazione funzionale **n.23**, 45
(functional evaluation)
- Ventilazione **n.23**, 7
(ventilation)
- Vie aeree **n.24**, 20
(airways)
- Volume corrente **n.22**, 16
(tidal breathing)
- Volumi polmonari **n.22**, 42
(lung volumes)



Domanda di ammissione per nuovi Soci

Il sottoscritto, CHIEDE AL PRESIDENTE della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili di essere ammesso quale socio ordinario. Pertanto, riporta i seguenti dati personali:

DATI PERSONALI

| | | | |
|---------------------------|-----------|--------|---------|
| Cognome | Nome | | |
| Luogo e data di nascita | | | |
| Domicilio (via/piazza) | | | |
| CAP | Città | Prov. | Regione |
| Sede di lavoro | | | Reparto |
| Indirizzo | | | |
| Recapiti telefonici: Casa | | Studio | Fax |
| Ospedale | Cellulare | | e-mail |

Laurea in Medicina e Chirurgia - Anno di laurea _____

Specializzazioni _____

Altri titoli _____

CATEGORIA

- Universitario Ospedaliero Pediatra di libera scelta

QUALIFICA UNIVERSITARIA

- Professore Ordinario Professore Associato Ricercatore Altro _____

QUALIFICA OSPEDALIERA

- Dirigente di 2° Livello Dirigente di 1° Livello Altro _____

Con la presente autorizzo la Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili al trattamento dei miei dati personali ai sensi del D.L. del 30 giugno 2003 n. 196.

Data _____ Firma del Richiedente _____

Soci presentatori (cognome e nome) _____ Firma _____

1) _____

2) _____

Compilare in stampatello e spedire insieme con la copia dell'avvenuto versamento (quota sociale di **euro 30,00. Specializzandi euro 10,00**) a:
Biomedica srl - Segreteria Amministrativa SIP - Via Libero Temolo 4, 20126 Milano
c/c postale N. **67412643** intestato a: **Società Italiana di Pediatria Conto Milano**
È obbligatoria l'iscrizione anche alla SIP (quota sociale di **euro 80,00**), può essere fatto un unico versamento indicando chiaramente nella causale per quali società affiliate viene effettuato il versamento.

Per informazioni: **Biomedica srl** - tel. **02/45498282** - fax **02/45498199** e-mail: **sip@biomedica.net**



Informazioni per gli autori

comprese le norme per la preparazione dei manoscritti

La Rivista pubblica contributi redatti in forma di editoriali, articoli d'aggiornamento, articoli originali, articoli originali brevi, casi clinici, lettere al Direttore, recensioni (da libri, lavori, congressi), relativi a problemi pneumologici e allergologici del bambino.

I contributi devono essere inediti, non sottoposti contemporaneamente ad altra Rivista, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia di etica della ricerca.

Gli Autori sono gli unici responsabili delle affermazioni contenute nell'articolo e sono tenuti a dichiarare di aver ottenuto il consenso informato per la sperimentazione e per la riproduzione delle immagini.

La redazione accoglie solo i testi conformi alle norme editoriali generali e specifiche per le singole rubriche.

La loro accettazione è subordinata alla revisione critica di esperti, all'esecuzione di eventuali modifiche richieste ed al parere conclusivo del Direttore.

NORME GENERALI

Testo: in lingua italiana o inglese, in triplice copia, dattiloscritto, con ampio margine, con interlinea doppia, massimo 25 righe per pagina, con numerazione delle pagine a partire dalla prima, e corredato di:

- 1) titolo del lavoro in italiano, in inglese;
- 2) parola chiave in italiano, in inglese;
- 3) riassunto in italiano, (la somma delle battute, spazi inclusi, non deve superare le 2.500);
- 4) titolo e didascalie delle tabelle e delle figure.

Si prega di allegare al manoscritto anche il testo memorizzato su dischetto di computer, purché scritto con programma Microsoft Word versione 4 e succ. (per Dos e Apple Macintosh).

Nella **prima pagina** devono comparire: il *titolo* (conciso); i *nomi* degli Autori e *l'istituto o Ente* di appartenenza; la *rubrica* cui si intende destinare il lavoro (decisione che è comunque subordinata al giudizio del Direttore); il *nome*, *l'indirizzo* e *l'e-mail* dell'Autore cui sono destinate la corrispondenza e le bozze.

Il manoscritto va preparato secondo le norme internazionali (Vancouver system) per garantire la uniformità di presentazione (BMJ 1991; 302: 338-341). È dunque indispensabile dopo una introduzione, descrivere i materiali e i metodi, indagine statistica utilizzata, risultati, e discussione con una conclusione finale. Gli stessi punti vanno riportati nel riassunto.

Nelle ultime pagine compariranno la bibliografia, le didascalie di tabelle e figure.

Tabelle (3 copie): devono essere contenute nel numero (evitando di presentare lo stesso dato in più forme), dattiloscritte una per pagina e numerate progressivamente.

Figure (3 copie): vanno riprodotte in foto e numerate sul retro. I grafici ed i disegni possono essere in fotocopia, purché di buona qualità.

Si accettano immagini su supporto digitale (floppy disk, zip, cd) purché salvate in uno dei seguenti formati: *tif, jpg, eps* e con una risoluzione adeguata alla riproduzione in stampa (300 dpi); oppure immagini generate da applicazioni per grafica vettoriale (Macromedia Freehand, Adobe Illustrator per Macintosh). Sono riproducibili, benché con bassa resa qualitativa, anche documenti generati da Power Point. Al contrario, non sono utilizzabili in alcun modo le immagini inserite in documenti Word o generate da Corel Draw.

La redazione si riserva di rifiutare il materiale ritenuto tecnicamente non idoneo.

Bibliografia: va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri arabi tra parentesi tonda (non in apice) ed elencate al termine del manoscritto nell'ordine in cui sono state citate. Se gli autori sono fino a quattro si riportano tutti, se sono cinque o più si riportano solo i primi tre seguiti da "et al".

Esempi di corretta citazione bibliografica per:

articoli e riviste:

Zonana J, Sarfarazi M, Thomas NST, et al. *Improved definition of carrier status in X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia by use of restriction fragment length polymorphism-based linkage analysis.* J Pediatr 1989; 114: 392-395.

libri:

Smith DW. *Recognizable patterns of human malformation.* Third Edition. Philadelphia: W.B Saunders Co. 1982.

capitoli di libri o atti di Congressi:

Krmpotic-Nemanic J, Kostovis I, Rudan P. *Aging changes of the form and infrastructure of the external nose and its importance in rhinoplasty.* In: Conly J, Dickinson JT, (eds). "Plastic and reconstructive surgery of the face and neck". New York, NY: Grune and Stratton 1972: 84-95.

Ringraziamenti, indicazioni di *grants* o borse di studio, vanno citati al termine della bibliografia.

Le note, contraddistinte da asterischi o simboli equivalenti, compariranno nel testo a piè di pagina.

Termini matematici, formule, abbreviazioni, unità e misure devono conformarsi agli standard riportati in Scienze 1954; 120: 1078.

I farmaci vanno indicati col nome chimico.

Per la corrispondenza scientifica:

Prof. Eugenio Baraldi
Dipartimento di Pediatria
Università di Padova
Via Giustiniani 3
35128 Padova
e-mail: baraldi@pediatria.unipd.it

RICHIESTA ESTRATTI

Gli estratti devono essere richiesti all'Editore contestualmente alle bozze corrette.

Gli estratti sono disponibili in blocchi da 25.

Il costo relativo, comprese le spese di spedizione in **contrassegno**, è il seguente:

- 25 estratti (fino a 4 pagine): € 60,00
- 25 estratti (fino a 8 pagine): € 80,00
- 25 estratti (fino a 12 pagine): € 100,00

Si applicano i seguenti sconti in funzione del numero di copie degli estratti:

- per 50 copie, sconto del 5% sul totale
- per 75 copie, sconto del 10% sul totale
- per 100 copie, sconto del 15% sul totale

ABBONAMENTI

Pneumologia Pediatrica è trimestrale. Viene inviata gratuitamente a tutti i soci della Società Italiana per le Malattie Respiratorie Infantili; i prezzi di abbonamento annuo per i non soci sono i seguenti:

Italia ed Estero: € 72,00; singolo fascicolo: € 20,00.

Le richieste di abbonamento e ogni altra corrispondenza relativa agli abbonamenti vanno indirizzate a:

Primula Multimedia S.r.l.
Via G. Ravizza, 22/b
56121 Pisa - Loc. Ospedaletto

Articoli del prossimo numero

Forthcoming articles

Farmacologia clinica degli antibiotici nella terapia delle infezioni delle basse vie respiratorie (LRTI)

- 1 *Clinical pharmacology of antimicrobial agents in the treatment of lower respiratory tract infections (LRTIs)*
F. Pea, et al.

La rinosinusite in età pediatrica

- 2 *Rhinosinusitis in childhood*
S. Esposito, et al.

Le polmoniti neonatali

- 3 *Neonatal pneumonia*
C. Moretti, et al.

Le polmoniti acquisite in comunità:
diagnosi e terapia

- 4 *Community acquired pneumonia: diagnosis and therapy*
R. Cutrera, et al.

Le polmoniti complicate:
dalla gestione medica alla soluzione chirurgica

- 5 *Complicated pneumonia: from medical care to surgical solutions*
F. M. de Benedictis, et al.

Epidemiologia e diagnosi dell'infezione tubercolare in età pediatrica

- 6 *Epidemiology and diagnosis of tuberculosis in children*
A. Guarino, et al.