



Applicazioni cliniche dell'espettorato indotto*

Christopher E. Brightling, PhD, MRCP, FCCP

Lo sviluppo di metodiche standardizzate per l'espettorato indotto ha migliorato la qualità e la riproducibilità dei campioni di espettorato. Questa tecnica è stata utilizzata per ottimizzare i campioni da utilizzare per la diagnosi di tubercolosi polmonare e carcinoma polmonare, ma la sua applicazione clinica come metodica non invasiva per la valutazione dello stato di infiammazione delle vie aeree ha messo in evidenza l'enorme potenziale di questa tecnica. L'induzione dell'espettorato ha permesso ai ricercatori di caratterizzare il profilo infiammatorio che caratterizza le diverse malattie delle vie aeree tra le quali l'asma, la BPCO e la tosse cronica. Ad oggi, l'identificazione di un'eosinofilia nell'espettorato indotto ha un elevato valore clinico poiché permette di predire una risposta favorevole al trattamento con corticosteroidi e può pertanto guidare la terapia. Nel trattamento dell'asma e della BPCO, i protocolli terapeutici finalizzati a normalizzare la presenza di eosinofili nell'espettorato indotto si sono dimostrati in grado di ridurre in maniera significativa le riacutizzazioni senza un ulteriore potenziamento della terapia. Al momento, nessun'altra metodica di studio delle vie aeree non invasiva ha dimostrato di garantire un tale beneficio nella riduzione delle esacerbazioni. Il valore dell'espettorato indotto e della sua analisi non è solo circoscritto al riconoscimento dell'eosinofilia nell'espettorato ma può essere anche usato per utilizzare nuove terapie dirette verso i neutrofili. Pertanto, sembra essere giunto il momento per l'espettorato di uscire dal campo della ricerca di laboratorio per entrare con pieno merito nella pratica clinica.

(*CHEST Edizione Italiana 2006; 2:80-84*)

Parole chiave: asma; BPCO; tosse; espettorato

Abbreviazioni: eNO = ossido nitrico esalato

L'analisi dell'espettorato nelle malattie respiratorie ha una lunga storia. Tuttavia, in molte situazioni cliniche l'analisi dell'espettorato indotto come utile strumento investigativo è stata posta in discussione a causa della difficoltà di ottenere un campione adeguato. Questo problema è stato superato con l'utilizzo della metodica di induzione dell'espettorato con soluzione salina ipertonica.¹ Questa tecnica è stata ora applicata a numerose e differenti condizioni cliniche. La migliorata quantità e qualità dei campioni di espettorato ottenuti con la tecnica di induzione fornisce una reale alternativa alla bronco-

scopia e al BAL nella diagnosi di tubercolosi polmonare ed ha rilanciato nuovo interesse sul ruolo della citologia dell'espettorato nel trattamento del carcinoma polmonare. Tuttavia, lo sviluppo negli ultimi 15-20 anni di questa tecnica come metodica non invasiva per misurare lo stato di infiammazione delle vie aeree ha focalizzato molta attenzione sulla potenziale utilità dell'applicazione clinica di questa metodica nella valutazione dell'infiammazione delle vie aeree.¹

Le malattie delle vie aeree contribuiscono in maniera significativa al carico di lavoro complessivo dello specialista pneumologo. Le principali malattie delle vie aeree quali l'asma bronchiale e la BPCO sono definite come caratterizzate da una tipica sintomatologia e da anomalie della fisiologia delle vie aeree, anche se è riconosciuto un ruolo ben definito da parte dell'infiammazione bronchiale come componente fondamentale in entrambe. Sebbene la misurazione della funzione polmonare sia un pre-requisito fondamentale per la diagnosi di asma e BPCO, la valutazione dell'infiammazione delle vie aeree non viene eseguita di routine. A questo scopo, sono oggi disponibili diverse tecniche che vanno dalla misurazione dell'ossido nitrico (eNO) nell'esalato² alla

*Dal Institute for Lung Health, University of Leicester, Glenfield Hospital, Leicester, UK.

Manoscritto ricevuto il 7 febbraio 2006; revisione accettata il 21 febbraio 2006.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians (www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml).

Corrispondenza: Christopher Brightling, PhD, MRCP, FCCP, Institute for Lung Health, University of Leicester, Glenfield Hospital, Groby Rd, Leicester, LE3 9QP, UK; e-mail: ceb17@le.ac.uk

(*CHEST 2006; 129:960-967*)

conta cellulare differenziale e alla misura delle concentrazioni di vari mediatori nell'espettorato indotto. La conta cellulare e la misura di mediatori nell'espettorato indotto sono state, in particolare, ben validate e ne sono stati pubblicati dei valori di riferimento per la popolazione adulta.³ L'induzione di espettorato è una procedura sicura e ben tollerata perfino in quei pazienti con malattia di grado grave o durante un'esacerbazione. Le linee guida della European Respiratory Society hanno dettagliatamente descritto le raccomandazioni per la sicurezza e la metodica dell'espettorato indotto.^{4,5} L'ampia applicazione dell'espettorato indotto in una varietà di malattie delle vie aeree e attraverso un ampio spettro di gravità di malattia ha fornito una spinta verso la ricerca di una relazione tra la funzione delle vie aeree e lo stato di infiammazione delle stesse, portando all'identificazione di nuovi fenotipi di malattia ed a definire quali di questi fenotipi rispondono alle terapie attuali e, soprattutto, ha fornito un utile strumento per guidare la gestione dei pazienti con malattie delle vie aeree.

Questo articolo riassume gli studi clinici che, allorché vengono rivisitati insieme, forniscono una forte evidenza a favore dell'utilità clinica dell'analisi dell'espettorato indotto. La maggior parte di questi studi è stata eseguita su pazienti asmatici, ma vengono presentate anche diverse evidenze che supportano un più ampio ruolo dell'analisi dell'espettorato nella BPCO, nella tosse cronica ed in altre condizioni patologiche.

ASMA

L'asma è comunemente associata ad eosinofilia nell'espettorato. Il valore normale per soggetti non fumatori è stato identificato intorno allo 0,4% con un novantesimo percentile fino all'1,1%. Fino all'80% dei pazienti asmatici che non hanno mai utilizzato corticosteroidi e circa il 50% dei pazienti trattati con corticosteroidi con sintomi asmatici hanno una conta di eosinofili nell'espettorato che è superiore a quella normale. La presenza percentuale di eosinofili nell'espettorato di pazienti asmatici è ampia, variando dallo 0% ad oltre il 50%. L'utilizzo di un valore soglia dell'1% come patologico incremento degli eosinofili nell'espettorato rispetto ai valori caratteristici delle normali vie aeree, ha permesso di introdurre l'eosinofilia nell'espettorato come un test diagnostico per l'asma (definita come presenza di sintomi caratteristici insieme con una o più dei seguenti elementi: concentrazione provocativa di metacolina in grado di indurre una caduta del 20% del FEV₁ < 8,0 mg/mL, un significativo incremento del FEV₁ dopo β₂-agonista o un anormale picco di flusso espiratorio), permettendo di ottenere una sensibilità superiore all'80% ed una specificità del 95%.⁷ in maniera analoga, aggiungere l'uso della conta cellulare differenziata nell'espettorato indotto alla misurazione del picco di flusso è utile per migliorare la capacità di diagnosi dell'asma occupazionale.⁸

Sebbene l'eosinofilia nell'espettorato sia una caratteristica tipica dell'asma, l'utilizzo sempre più frequente di questa metodica ha portato al riconoscimento che l'infiammazione nell'asma è più eteroge-

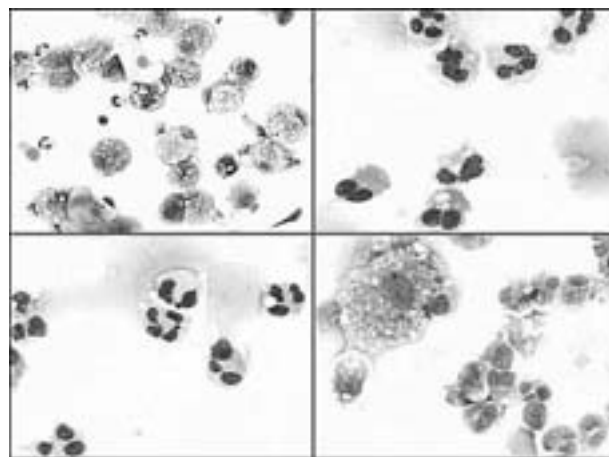


FIGURA 1. Citocentrifugati di espettorato da diversi pazienti con asma che mettono in evidenza l'eterogeneità dell'infiammazione delle vie aeree. *In alto, a sinistra*: Le cellule predominanti sono i macrofagi insieme a una normale conta di neutrofili ed eosinofili: questo citocentrifugato non può essere distinto da quello ottenuto da un normale soggetto di controllo (asma pauci-granulocitica, ingrandimento x 100). *In alto, a destra*: Infiammazione mista neutrofila e eosinofila (ingrandimento x 400). *In basso, a sinistra*: Infiammazione neutrofila (ingrandimento x 400). *In basso, a destra*: Infiammazione eosinofila (ingrandimento x 400).

nea di quanto si credeva in passato (Figura 1), con l'identificazione di forme di asma non eosinofila.^{6,9,10} L'asma non eosinofila è comune, con una prevalenza tra il 25 il 55% tra i pazienti asmatici che non hanno mai eseguito terapia cortisonica; è presente a tutti i livelli di gravità della malattia; è stato osservato che alcuni soggetti con asma non eosinofila possono acquisire successivamente una forma di asma eosinofila.¹¹ L'identificazione dell'asma non eosinofila è importante poiché questa forma è associata ad una scarsa risposta ai corticosteroidi.⁹ In contrasto, i pazienti asmatici con eosinofili nell'espettorato hanno una risposta favorevole ai corticosteroidi, anche negli ex-fumatori e nei fumatori.¹² Little e coll.¹³ hanno osservato che in pazienti con asma, una conta eosinofila nell'espettorato > 4% ha un valore predittivo positivo del 68% con una sensibilità del 59% ed una specificità del 76% per un miglioramento del FEV₁ > 15% dopo un ciclo di terapia di 2 settimane con corticosteroidi orali. L'eosinofilia nell'espettorato indotto era potenzialmente correlata con il grado di miglioramento clinico in risposta ai cortisonici inalatori e risultava essere più strettamente correlata al miglioramento clinico rispetto all'eNO, o alla proteina eosinofila cationica nell'espettorato o nel sangue periferico.¹⁴ Nessuno di questi studi precedenti era placebo-controllato, ma un recente trial cross-over placebo-controllato¹⁵ condotto con mometasone inalato, 400 µg quattro volte al giorno per 8 settimane, in soggetti affetti da asma con o senza eosinofilia al momento del reclutamento nello studio, ha confermato che una risposta favorevole al trattamento con corticosteroidi era riservata ai pazienti asmatici con eosinofilia nell'espettorato.

È importante osservare che la valutazione dello stato di infiammazione delle vie aeree tramite l'analisi dell'espettorato assume un'importanza che va oltre quella emersa in questi studi, relativamente a breve

termine, sulla responsività al trattamento con corticosteroidi. Studi condotti allo scopo di indagare gli effetti della riduzione del dosaggio dei corticosteroidi^{16,17} hanno dimostrato che l'eosinofilia nell'espettorato compare molto prima dell'insorgenza di una riacutizzazione, suggerendo che una terapia dell'asma bronchiale che si propone come obiettivo quello di normalizzare la conta degli eosinofili nell'espettorato potrebbe condurre ad una significativa riduzione delle esacerbazioni dell'asma. Infatti, esiste ora una chiara evidenza, proveniente dai risultati di due studi indipendenti,^{11,18} che sottolinea l'importanza di monitorare l'infiammazione delle vie aeree tramite l'espettorato indotto per ridurre il numero di esacerbazioni dell'asma. In uno studio randomizzato, placebo controllato,¹¹ 74 soggetti con asma sono stati divisi in due gruppi. Un gruppo ha eseguito una terapia mirata a normalizzare l'eosinofilia nell'espettorato, un altro ha eseguito la terapia standard per l'asma bronchiale secondo le attuali linee guida (gruppo di controllo). I pazienti nel gruppo con terapia mirata alla normalizzazione degli eosinofili nell'espettorato hanno registrato un numero di esacerbazioni gravi di asma significativamente minore rispetto ai pazienti del gruppo di controllo (35 esacerbazioni vs 109 esacerbazioni, $p = 0,01$) [Figura 2]. Sempre nel gruppo con terapia mirata alla normalizzazione degli eosinofili, un numero significativamente minore di pazienti ha avuto la necessità di ricorrere alle cure ospedaliere per l'asma (un paziente vs sei pazienti, $p = 0,047$). La riduzione del numero di esacerbazioni veniva raggiunta senza un incremento nella dose totale di corticosteroidi utilizzata nel gruppo di pazienti

sottoposti a monitoraggio dell'eosinofilia nell'espettorato, poiché lo studio dello stato di infiammazione delle vie aeree nel gruppo di pazienti sottoposti a espettorato indotto permetteva di identificare un gruppo di pazienti con asma non eosinofila nei quali la conta degli eosinofili nell'espettorato rimaneva nei limiti dei valori normali; in questi pazienti, la dose di corticosteroidi veniva ridotta senza alcuna evidenza di un peggioramento del controllo sintomatico. In un secondo trial,¹⁸ condotto su 117 pazienti asmatici reclutati per un uno studio di efficacia multicentrico, randomizzato a gruppi paralleli della durata di 2 anni, il trattamento mirato alla normalizzazione degli eosinofili nell'espettorato ha condotto ad una riduzione delle esacerbazioni (79 esacerbazioni vs 47 esacerbazioni, $p = 0,04$) e ad un incremento del tempo di intervallo per la prima esacerbazione a 213 giorni. Questo beneficio non era raggiunto grazie ad un incremento della terapia nel gruppo sottoposto ad espettorato indotto. In questo studio, veniva caratterizzato il fenotipo infiammatorio dell'esacerbazione; e nel gruppo sottoposto a terapia mirata secondo l'analisi dell'espettorato veniva ridotto il numero delle esacerbazioni eosinofile ma non quello delle esacerbazioni non-eosinofile. È interessante notare che le esacerbazioni non-eosinofile erano più comuni (56%). La riduzione del numero di esacerbazioni era più evidente in quei pazienti con asma grave. Ciò suggerisce che è probabilmente più appropriato applicare tale tecnica nel trattamento di quei casi di asma difficili da trattare o refrattari alla terapia convenzionale, ma il suo uso non può essere generalizzato nei confronti della popolazione generale.

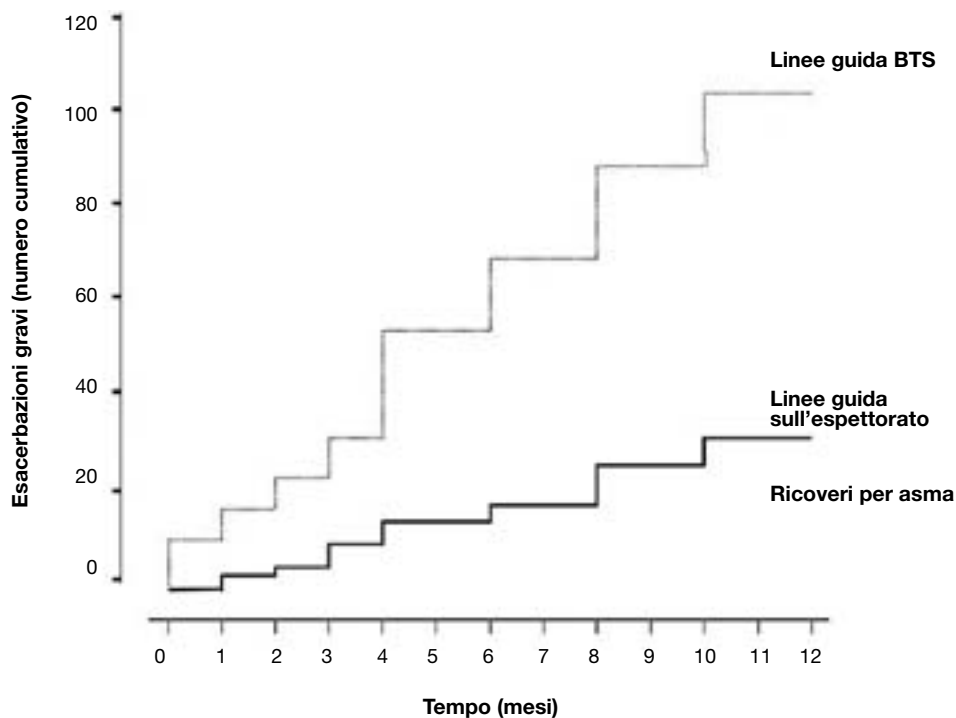


FIGURA 2. Esacerbazioni gravi in soggetti con asma trattati secondo le linee guida standard della British Thoracic Society (BTS) rispetto ai soggetti trattati seguendo un algoritmo diretto a normalizzare i valori della conta cellulare nell'espettorato. I pazienti del gruppo con trattamento mirato nei confronti dell'espettorato avevano meno esacerbazioni gravi ($p < 0,01$), e meno pazienti dovevano essere ricoverati in ospedale ($p = 0,047$). Adattato da Green e coll.¹¹

L'inclusione dell'espettorato indotto nel trattamento dei pazienti con asma bronchiale si è inoltre dimostrato essere efficace nel contenimento dei costi. Analisi economiche hanno dimostrato che le spese sanitarie risparmiate grazie alla riduzione delle esacerbazioni dell'asma sono di gran lunga maggiori rispetto ai costi dell'induzione e della processazione dell'espettorato indotto.¹¹ L'induzione dell'espettorato è una tecnica di laboratorio relativamente laboriosa e richiede un supporto di macchinari di laboratorio anche se tutte le apparecchiature necessarie sono normalmente disponibili nei comuni laboratori di patologia ed è richiesto solo un addestramento minimo. Pertanto, l'induzione dell'espettorato dovrebbe essere disponibile come esame di routine nei centri specialistici per una migliore valutazione e trattamento dei pazienti con asma grave.

Il valore dell'espettorato indotto è maggiore nei casi di asma grave; pertanto, nei casi di asma più lieve potrebbe essere indicata un'alternativa più semplice e non invasiva. L'eNO è stato proposto come una possibile alternativa all'espettorato indotto, ma, in chiaro contrasto con quanto è noto rispetto all'espettorato indotto, studi a lungo termine che hanno utilizzato protocolli terapeutici guidati dai valori di eNO hanno fallito nel dimostrare, rispetto alla terapia convenzionale, una riduzione del numero di esacerbazioni dell'asma negli adulti¹⁹ e nei bambini.²⁰ Così, ad oggi, l'espettorato indotto rappresenta l'unica metodica non invasiva per lo studio dello stadio di infiammazione delle vie aeree che ha dimostrato di possedere un ruolo nel trattamento dei casi di asma moderata-grave e, pertanto, si rende necessario un regolare studio dell'infiammazione delle vie aeree in questi pazienti per raggiungere un trattamento farmacologico ottimale.

BPCO

Nella BPCO, la conta dei neutrofili nell'espettorato è frequentemente aumentata ed è correlata con la riduzione del FEV₁ e con un'aumentata velocità nel declino del FEV₁, suggerendo ciò che l'infiammazione neutrofila delle vie aeree sia funzionalmente importante.²¹ Fino al 40% dei soggetti con BPCO hanno una conta di eosinofili nell'espettorato > 3%.^{22,23} Questi soggetti non sono distinguibili dai soggetti senza eosinofili nell'espettorato sulla base delle caratteristiche cliniche o della funzionalità polmonare. Vi è una crescente evidenza che la presenza di eosinofili nell'espettorato sia in grado di predire nei pazienti con BPCO una risposta obiettiva al trattamento con corticosteroidi orali^{22,23} o inalatori.²⁴ In uno studio,²² la risposta ad un ciclo di terapia con prednisolone orale della durata di due settimane in termini di funzionalità polmonare, stato di salute e tolleranza all'esercizio fisico aumentava con l'aumentare del numero di eosinofili nell'espettorato indotto raccolto all'inizio dello studio ed era associata con una marcata riduzione degli eosinofili nell'espettorato pur senza alcuna modificazione riguardo altri marker di infiammazione neutrofila nell'espettorato. Ciò suggerisce che l'infiammazione eosinofila delle vie aeree sia funzionalmente importante in alcuni soggetti con BPCO e che gli effetti benefici dei corticoste-

roidi siano dovuti alla modificazione di tale aspetto all'interno del complesso quadro di infiammazione presente a livello delle vie aeree.

Alla luce dei benefici ottenuti nel trattamento dei pazienti asmatici utilizzando il monitoraggio degli eosinofili nell'espettorato indotto, l'applicazione clinica dell'espettorato indotto nel trattamento dei pazienti con BPCO è stata recentemente studiata in un gruppo di 80 soggetti con BPCO. Lo studio è stato condotto in un periodo di tempo di 12 mesi ed è stato osservato che, rispetto al trattamento convenzionale basato sul controllo dei sintomi, un approccio terapeutico finalizzato anche a ridurre la conta degli eosinofili nell'espettorato < 3% utilizzando i corticosteroidi era associato ad una riduzione del 62% nel numero di gravi esacerbazioni di BPCO che richiedevano l'ospedalizzazione.²⁵ Di nuovo, questo miglior controllo della malattia non era ottenuto con un complessivo uso maggiore della terapia con corticosteroidi. Pertanto, così come per l'asma, la valutazione della conta degli eosinofili nell'espettorato indotto può essere utilizzata per identificare quei pazienti con BPCO con malattia responsiva ai corticosteroidi e adattare l'approccio terapeutico. Questo potenziale ruolo dell'espettorato indotto nel trattamento della BPCO ha bisogno di ulteriori conferme da parte di studi futuri per valutare quali benefici di particolari sottogruppi di pazienti necessitano di essere stabiliti. Per queste ragioni, è prematuro, al momento attuale, raccomandare l'espettorato indotto nel trattamento di routine dei pazienti con BPCO.

Le attuali terapie per la BPCO e per l'asma hanno un effetto limitato sull'infiammazione neutrofila. L'espettorato indotto fornisce un eccellente strumento di ricerca per valutare l'effetto di terapie sperimentali sull'infiammazione neutrofila ed è probabile che in futuro l'espettorato indotto permetterà di dirigere non solo terapie mirate contro la componente eosinofila, ma permetterà ai medici anche di disegnare uno specifico trattamento per quei pazienti con un'infiammazione neutrofila predominante.

TOSSE

Fino al 30% dei pazienti con tosse hanno una conta eosinofila nell'espettorato < 3%.²⁶ Metà di questi soggetti non dimostrano alcuna evidenza funzionale di asma bronchiale ma sono affetti da bronchite eosinofila non asmatica.^{26,27} La valutazione dello stato di infiammazione delle vie aeree è il solo modo di identificare questi soggetti ed è, pertanto, un passo fondamentale nell'iter diagnostico di questi pazienti. Ciò è stato riconosciuto nelle linee guida sulla tosse stilate dall'American College of Chest Physicians e l'espettorato indotto è la procedura diagnostica raccomandata per confermare la diagnosi di bronchite eosinofila non asmatica.²⁸ I macrofagi contenenti lipidi opportunamente colorati sono stati proposti come un marker di reflusso gastroesofageo, ma il loro valore nella valutazione del paziente con tosse cronica non è chiaro e non è attualmente raccomandato.²⁹

L'espettorato indotto è utile non solo nella valutazione delle cause di tosse cronica, ma, così come accade per l'asma e la BPCO, tale metodica può essere utile per identificare quei pazienti che probabil-

mente risponderanno ai corticosteroidi. Pazienti con tosse e eosinofili nell'espettorato esibiscono un'obiettiva risposta al trattamento con corticosteroidi che si realizza parallelamente con una riduzione del numero degli eosinofili nell'espettorato.²⁶ In contrasto pazienti senza eosinofili nell'espettorato non rispondono al trattamento con corticosteroidi.³⁰

ALTRE CONDIZIONI

Poco è conosciuto a riguardo delle caratteristiche cellulari dell'espettorato in altre malattie respiratorie. Nella fibrosi polmonare idiomatica è riportata un'inflammatione di tipo sia neutrofilico che eosinofilo, ma una problematica con l'espettorato indotto nella valutazione delle malattie polmonari interstiziali è che l'espettorato rappresenta principalmente l'inflammatione presente soprattutto a livello della grandi vie aeree prossimali e non rappresenta la metodica migliore per studiare l'alveolite linfocitaria. Vi è un'emergente evidenza che l'espettorato indotto possa rappresentare un utile strumento per quantificare l'esposizione ambientale a particolato carbonaceo, muffe e pollini; riconoscere l'esposizione a minerali in malattie polmonari professionali; identificare batteri intracellulari; identificare macrofagi contenenti emoderina nei pazienti con insufficienza ventricolare sinistra. Queste nuove applicazioni dell'espettorato indotto meritano ulteriori e più approfonditi studi.

CONCLUSIONI

L'induzione dell'espettorato ha numerose applicazioni cliniche. Vi è una forte evidenza per la sua utilità nella diagnosi della tosse cronica e per un suo ruolo per ottimizzare il trattamento farmacologico nei pazienti asmatici con malattia di grado grave. Altre evidenze a favore di un suo ruolo nella BPCO stanno emergendo, ed il potenziale ruolo dell'espettorato indotto come strumento diagnostico in un buon numero di altre condizioni patologiche è da tenere in considerazione. Al momento, nessuna altra metodica di studio delle vie aeree non invasiva ha dimostrato di essere utile per raggiungere una riduzione del numero di esacerbazioni attraverso un'ottimizzazione del trattamento in pazienti con malattie delle vie aeree. Pertanto, sembra essere giunto il momento per l'espettorato di uscire dal campo della ricerca di laboratorio per entrare con pieno merito nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, et al. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; 52:498-501
- 2 Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:2104-2117
- 3 Belda J, Leigh R, Parameswaran K, et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2 pt 1):475-478
- 4 Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, et al. Safety of sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 20(37suppl):9S-18S
- 5 Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and *in situ* hybridisation. *Eur Respir J* 2002; 20(37suppl):19S-23S
- 6 Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002; 57:875-879

- 7 Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, et al. A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. *Chest* 2002; 121:1051-1057
- 8 Girard F, Chaboillez S, Cartier A, et al. An effective strategy for diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:845-850
- 9 Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, et al. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999; 353:2213-2214
- 10 Gibson PG, Simpson JL, Salto N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001; 119:1329-1336
- 11 Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360:1715-1721
- 12 Bacci E, Cianchetti S, Bartoli M, et al. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006; 129:565-572
- 13 Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, et al. Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax* 2000; 55:232-234
- 14 Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, et al. Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1096-1103
- 15 Berry MA, Morgan A, Green RH, et al. Clinical and pathological features of non-eosinophilic asthma: a distinct asthma phenotype associated with inhaled corticosteroid resistance [abstract]. *Thorax* 2005; 60:ii4
- 16 Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006; 27:483-494
- 17 Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:406-412
- 18 Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:64-72
- 19 Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352:2163-2173
- 20 Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, et al. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:831-836
- 21 Stanescu D, Sanna A, Veriter C, et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV₁ in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996; 51:267-271
- 22 Brightling CE, Monteiro W, Ward R, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2000; 356:1480-1485
- 23 Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 pt 1):1511-1517
- 24 Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, et al. Sputum eosinophilia and the short term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60:193-198
- 25 Siva R, Green RH, Brightling CE, et al. Modulation of eosinophilic inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2005; 26(Suppl 49):441s
- 26 Brightling CE, Ward R, Goh KL, et al. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:406-410
- 27 Brightling CE. Chronic cough due to nonasthmatic eosinophilic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129(suppl):116S-121S
- 28 Melvin R, Pratter MR, Brightling CE, et al. An empiric integrative approach to the management of cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129(1 suppl):222S-231S
- 29 Irwin RS. Chronic cough due to gastroesophageal reflux disease: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129(1 suppl):80S-89S
- 30 Pizzichini MM, Pizzichini E, Parameswaran K, et al. Nonasthmatic chronic cough: no effect of treatment with an inhaled corticosteroid in patients without sputum eosinophilia. *Can Respir J* 1999; 6:323-330