



Studio dell'esalato condensato: il futuro?

La diagnostica della patologia respiratoria tende ad avvalersi sempre di più di metodiche non invasive che possono ridurre significativamente la morbilità connessa alle procedure invasive utilizzate con il risultato che le tecniche diagnostiche del polmone profondo, risulteranno sempre meglio accettate dai pazienti e facilmente ripetibili.¹ E così, allo studio del materiale raccolto con indagini quali la broncoscopia e le aspirazioni con ago, che sono caratterizzate da un evidente grado di invasività che può renderle non sempre proponibili in tutti i pazienti, in questi ultimi anni si è aggiunto lo studio dell'aria esalata e dell'espettorato indotto.^{1,2}

Quest'ultimo, sebbene di scarsissima invasività e di dimostrata utilità nel monitoraggio dell'asma, prevede nella maggior parte dei casi l'inalazione di una soluzione salina ipertonica, che come evidenziato nel lavoro pubblicato recentemente su *CHEST* dal nostro gruppo (Uso dell'esalato condensato nello studio dell'infiammazione aerea dopo challenge con soluzione salina ipertonica. *CHEST* 2005; 128: 3159-3166) è in grado di determinare una flogosi di lieve entità nelle vie aeree come dimostrato dall'aumento dei marker flogistici nell'esalato condensato di pazienti sottoposti alla procedura.² È la prima volta che l'esalato condensato, metodica che per le sue caratteristiche di esecuzione non influenza e non altera la composizione del campione raccolto, è stato utilizzato per studiare gli effetti dell'esposizione a soluzione salina ipertonica comunemente utilizzata per l'induzione dell'espettorato. La flogosi non è presente invece nei casi in cui l'espettorato viene indotto con inalazione di soluzione salina isotonica. Anche altri autori hanno evidenziato la presenza di flogosi in seguito ad esposizione a soluzione ipertonica, il che limita in qualche maniera questo esame.³

La valutazione non invasiva di biomarker come l'ossido nitrico nell'aria esalata e di altri mediatori possibili dosabili nella condensa dell'aria esalata quali l'adenosina, peptidi, ioni, protoni, citochine, leucotrieni ecc. sta riscuotendo un crescente interesse, nonostante non tutto è chiaro sull'affidabilità

di questa metodica. Per superare questi limiti, l'American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) Task Force sull'esalato condensato ha recentemente pubblicato delle linee guida per la raccolta e la misura dei biomarker nel condensato dell'espurato.⁴ In queste linee guida si ritrovano limiti e raccomandazioni sul possibile uso di questa metodica e si evidenziano le aree che richiedono ulteriori approfondimenti.

L'esalato condensato è un fluido costituito dalla condensazione dell'"epithelial lining fluid", aerosolizzato dal flusso turbolento che si crea nelle vie aeree e dalla condensazione delle sostanze volatili presenti nel vapor d'acqua di cui è saturata l'aria espirata (più del 99% del suo contenuto). Il gas esalato viene fatto passare attraverso un sistema di condensazione che ne determina un cambio di stato fisico a fluido. Durante il respiro a volume corrente richiesto per la raccolta, sono aereosolizzate particelle della grandezza di 0,1-4 cm⁻³ e con un diametro di 0,3 μm.⁵⁻⁷

Il condensato esalato contiene composti che riflettono il movimento biochimico polmonare in condizioni di normalità e di patologia. La sua analisi può dunque fornire elementi preziosi per approfondire le nostre conoscenze sulla patogenesi delle malattie polmonari e per monitorarne la loro evoluzione e risposta ai trattamenti. Tuttavia, al momento, sebbene moltissime evidenze sperimentali dimostrino la validità dell'esalato condensato per lo studio non invasivo di svariate sostanze o mediatori nelle vie aeree in varie patologie polmonari o condizioni patologiche, questa metodica non ha ancora trovato spazio nella pratica clinica.⁸⁻¹⁴

Fra le raccomandazioni suggerite nell'ultimo statement ERS/ATS sul condensato esalato, si consiglia l'uso di uno stringinaso, la posizione seduta, una respirazione a volume corrente, la sospensione dall'assunzione di cibo, bevande, medicinali, fumo almeno tre ore prima della raccolta, l'uso di materiale inerte sulla superficie di raccolta e di un sistema di filtro per la saliva.⁴ Dieci minuti sono quelli raccomandati per la raccolta della maggior parte dei mediatori dal momento che garantiscono la raccolta di un sufficiente volume di campione e sono ben tollerati dai pazienti. La raccolta dell'esalato condensato è sicura, non influenza la funzionalità respiratoria, è ripe-

tibile, anche a brevi intervalli, non è accompagnata da eventi avversi.¹⁵ Un limite di questa metodica è sicuramente rappresentato dai sistemi di misura dei marker studiati che ancora oggi non risultano sufficientemente sensibili. Molti dei sistemi utilizzati sono inoltre laboriosi e richiedono lunghi tempi di esecuzione. Il fatto che non si conosca ancora l'esatta sede di provenienza dei mediatori in esame né un validato metodo per calcolare il fattore di diluizione del campione rende inoltre meno facile l'interpretazione dei risultati.⁴ Le linee guida consigliano a questo riguardo di riportare con precisione i dettagli sulla riproducibilità delle misurazioni intra- e intercampione valutati con test appropriati come il Bland e Altman o il coefficiente di variazione e la specificità del più basso valore misurabile (che varia significativamente a seconda del kit commerciale utilizzato).⁴

Dal momento che la misurazione on-line è limitata ancora solo a poche sostanze quali il pH e l'H₂O₂, si consiglia di conservare il campione raccolto a -70° C, temperatura alla quale è garantita la stabilità di molti mediatori.

Al momento, il pH sembra il marker più facilmente misurabile e ripetibile.¹⁶

Il futuro di questa metodica sembra tuttavia riservato a nuovi campi di studio quali la proteomica, la metabolomica. Dimostrata la possibilità di estrarre DNA umano da questo campione e analizzarlo con le più moderne tecnologie, anche la strada della genomica sembra poter aprire i suoi battenti allo studio dell'esalato condensato.¹⁷

*Maria Pia Foschino Barbaro¹, MD, FCCP
Onofrio Resta², MD, FCCP*

¹ Istituto di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università degli Studi di Foggia.

² Istituto di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università degli Studi di Bari, Governor ACCP Capitolo Italiano.

BIBLIOGRAFIA

1 Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B₄ and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *AJRCCM* 2003; 167(8):1109-12.

- 2 Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J* 2002; 20: Suppl. 37, 51s-55s.
- 3 Umeno E, McDonald DM, Nadel JA. Hypertonic saline increases vascular permeability in the rat trachea by producing neurogenic inflammation. *J Clin Invest* 1990; 85(6):1905-8.
- 4 American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2104-2117.
- 5 Fairchild CI, Stampfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987; 48: 948-949.
- 6 Papinen RS, Rosenthal FS. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J Aerosol Med* 1997; 10: 105-116.
- 7 Fritter D, Knobler CM. Experiments and simulation of the growth of droplets on a surface (breath figures). *Physical Review A* 1991; 43: 2858-2869.
- 8 Carpagnano GE, Foschino Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Valerio NV, Bracciale P, Valerio G. Exhaled markers in the monitoring of airways inflammation and its response to steroid's treatment in mild persistent asthma. *Eur J Pharmacol.* 2005 Sep 5; 519(1-2):175-81.
- 9 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Supplementary oxygen in healthy subjects and those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. *Thorax.* 2004 Dec; 59(12):1016-9.
- 10 Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Stefano A, Di Gioia G, Serviddio G, Gramiccioni E. Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys). *Eur J Pharmacol.* 2004 Nov 28; 505(1-3):169-75.
- 11 Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Carpagnano F. Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology.* 2004; 66(3):180-4.
- 12 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J.* 2003 Apr; 21(4):589-93.
- 13 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest.* 2002 Oct; 122(4):1162-7.
- 14 Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Carpagnano F. Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers.* 2002 Apr-Jun; 17(2):141-5.
- 15 Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for non-invasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 28-34.
- 16 Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. Breath condensate pH in children with CF and asthma: a new non-invasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004 Jun; 125(6):2005-10.
- 17 Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Mulè G, Resta O, Tommasi S, Mangia A, Carpagnano F, Stea G, Susca A, Di Gioia G, De Lena M and Paradiso A. 3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from non-small cell lung cancer patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172:1-7.