

# Espettorato indotto e patologie dell'apparato respiratorio

## Induced sputum and respiratory airway diseases

### Riassunto

L'espettorato indotto è una metodica non invasiva, utile per la valutazione dell'infiammazione nelle vie aeree. L'espettorato viene indotto tramite l'inalazione di soluzione salina ipertonica facendo precedere questa fase dal trattamento del paziente con  $\beta_2$  agonisti per evitare una broncocostrizione. Dopo la fase di induzione il soggetto viene invitato a tossire e a produrre espettorato. Il materiale raccolto viene inviato entro 2 ore al laboratorio dove viene solubilizzato per poter valutare il numero totale e la conta differenziale delle cellule infiammatorie. L'espettorato di un soggetto sano è principalmente costituito da macrofagi e neutrofili, mentre eosinofili, linfociti e cellule epiteliali bronchiali sono scarsamente rappresentate. La gran parte degli asmatici presenta un incremento degli eosinofili nell'espettorato ma vi sono anche pazienti con infiammazione neutrofilica o paucigranulare. La presenza di eosinofili nell'espettorato è in genere un indice di buona risposta agli steroidi inalatori o sistemici, mentre la presenza di neutrofili suggerisce una diversa scelta terapeutica essendo queste cellule scarsamente responsive agli steroidi. I neutrofili sono inoltre le cellule infiammatorie più presenti nell'espettorato dei pazienti con bronchite cronica ostruttiva (BPCO) e durante un'esacerbazione di malattia la cellularità totale e i neutrofili aumentano nell'espettorato. Nella BPCO, la presenza di eosinofili nell'espettorato può precedere una riacutizzazione e fa comunque prevedere una buona risposta agli steroidi. Nel sovrannatante dell'espettorato processato si possono valutare diversi mediatori solubili, in particolare molte citochine, chemochine e marker dell'infiammazione e dello stress ossidativo ma nessuno di questi mediatori si è rilevato particolarmente utile per la diagnosi o il follow up dei pazienti con patologie respiratorie. La gran parte degli studi sull'espettorato è stata svolta in soggetti asmatici o con BPCO ma la scarsa invasività della metodica ha consentito la sua applicazione anche allo studio di altre malattie respiratorie come la bronchite eosinofila, la fibrosi cistica, le malattie interstiziali del polmone.

### Summary

*Induced sputum is a noninvasive technique useful to assess airway inflammation. Sputum is induced through the inhalation of ultrasonic nebulized hypertonic saline solution and pre-treatment of the subject with  $\beta_2$  agonist is recommended to avoid bronchoconstriction. After the inhalation period the subject is invited to cough and to produce sputum. The sample is sent to the laboratory within 2 hours where it is solubilised in order to evaluate total cells and differential inflammatory cell count. Sputum of a healthy subject is mainly constituted by macrophages and neutrophils while eosinophils, lymphocytes and epithelial cells are only rarely present. Most asthmatic subjects have an increase of eosinophils in their sputum samples but neutrophilic or paucigranular patterns are also found in asthmatics' airways. Sputum eosinophils are usually predictors of a good response to inhaled or systemic corticosteroid therapy, whereas the presence of neutrophils in induced sputum, suggests a different therapeutic choice since neutrophils are not responsive to steroids. Furthermore, neutrophils are the most represented inflammatory cells in the sputum samples of subjects with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Total cells and sputum neutrophils increase during disease exacerbation. In the sputum of COPD subjects, the presence of eosinophils can precede an exacerbation and envisages a favourable response to steroids. Soluble mediators can be measured in the supernatant of processed induced sputum samples, particularly many cytokines, chemokines and other markers of inflammation and oxidative stress, but none of them seems to be particularly useful for the diagnosis or for the follow-up of patients with respiratory diseases. The majority of studies on induced sputum are conducted on asthmatic and COPD subjects but the scarce invasiveness of the procedure also allows its application in other pulmonary diseases such as eosinophilic bronchitis, cystic fibrosis, interstitial lung diseases.*



Patrizia Pignatti\*  
Andrea Zanini\*\*\*\*  
Francesca Cherubino\*\*  
Gianna Moscato\*  
Antonio Spanevello\*\* \*\*\* (foto)

\* Servizio Autonomo di Allergologia e Immunologia Clinica, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia;  
\*\* Dipartimento di Pneumologia Riabilitativa, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Tradate, Varese;  
\*\*\* Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

### Parole chiave

Espettorato indotto • Eosinofili  
• Neutrofili • Infiammazione delle vie aeree • Asma • Bronchite cronica ostruttiva

### Key words

Induced sputum • Eosinophils • Neutrophils • Airway inflammation • Asthma • Chronic obstructive pulmonary disease

Ricevuto il 3-2-2013.

Accettato il 19-2-2013.



Antonio Spanevello  
Reperto di Pneumologia Riabilitativa, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS  
via Roncaccio, 16  
21049 Tradate (VA)  
antonio.spanevello@fsm.it  
antonio.spanevello@uninsubria.it

## Introduzione

L'espettorato indotto è una metodica usata per la valutazione dell'infiammazione delle vie aeree, in particolare nei pazienti con asma e BPCO, ma anche in altre patologie polmonari caratterizzate da infiammazione delle vie aeree<sup>1-3</sup>.

**L'espettorato indotto è una metodica usata per la valutazione dell'infiammazione delle vie aeree.**

L'incapacità di alcuni soggetti di espettorare spontaneamente ha portato alla messa a punto di un metodo di induzione dell'espettorato tramite inalazione di soluzione salina ipertonica o isotonica. I numerosi lavori pubblicati sull'espettorato, molti con metodi di induzione e processazione diversi tra loro, hanno determinato la necessità di una standardizzazione della metodica, allo scopo di confrontare risultati provenienti da laboratori diversi. Nel 2002 è stato pubblicato un documento che riassume le indicazioni di una Task Force della Società Europea di Pneumologia (European Respiratory Society, ERS), riguardanti l'induzione, la sicurezza nell'esecuzione del test, la processazione del campione e il significato clinico dei risultati ottenuti<sup>4-7</sup>.

## Metodo dell'espettorato indotto: fase di induzione

La procedura utilizzata per facilitare il processo di espettorazione prevede l'inalazione da parte del paziente di una soluzione salina sterile ipertonica (4-5%) o isotonica (0,9%) nebulizzata per 4 intervalli di 5 minuti ciascuno. Considerato che l'inalazione potrebbe determinare in alcuni soggetti broncocostrizione, il paziente viene trattato con broncodilatatore (200 mg di salbutamolo) prima della fase di induzione. Quindi si procede alla nebulizzazione della soluzione salina, il paziente dopo ogni periodo di inalazione viene invitato a tossire e a cercare di espettorare in un contenitore sterile. L'eccesso di saliva che si può accumulare in alcuni casi, viene raccolto separatamente dall'espettorato. Durante l'intera procedura si effettua un attento controllo della funzionalità respiratoria tramite spirometria, prima e dopo ogni periodo di inalazione e in caso di significativa broncocostrizione (caduta del FEV<sub>1</sub> > 20%) la fase di induzione viene interrotta. Nei soggetti con FEV<sub>1</sub>/FVC < 70% dopo salbutamolo, è possibile comunque procedere alla fase di induzione con un protocollo modificato che prevede l'utilizzo di soluzione salina isotonica e uno stretto monitoraggio della funzionalità respiratoria. Nonostante la relativa sicurezza della procedura, l'induzione va eseguita da personale tecnico debitamente preparato e in locali idonei con personale di rianimazione a disposizione.

Una volta terminata l'induzione, il materiale raccolto è inviato al laboratorio per la processazione che do-

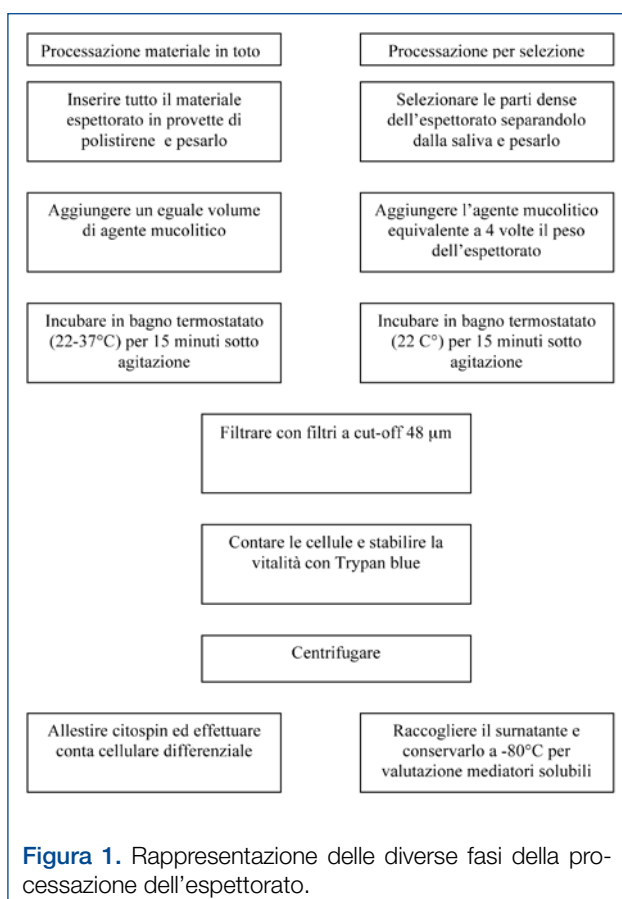
vrebbe avvenire entro 2 ore dall'induzione, mantenendo sempre il campione a +4°C.

L'espettorato indotto è una metodica che può essere eseguita anche nei bambini maggiori di 6 anni, con relativa sicurezza. È stato riportato che il pre-trattamento con  $\beta$ 2 agonisti evita nella gran parte dei casi infatti broncocostrizione e solo il 6% circa dei bambini sottoposto a questa procedura è andato incontro ad una caduta del FEV<sub>1</sub> del 10%. L'induzione ha inoltre una percentuale di successo nei bambini comunque soddisfacente che si traduce nella possibilità di ottenere materiale idoneo per la processazione e la valutazione dell'infiammazione<sup>8</sup>.

## Metodo dell'espettorato indotto: fase di processazione

Le linee guida sull'espettorato indotto prevedono due metodi: la processazione del campione "in toto" e la selezione tramite pinzetta ed ausilio di microscopio ottico invertito delle zone più dense (plugs) presenti nel materiale espettorato allo scopo di evitare il più possibile la contaminazione salivare<sup>5</sup>. In Figura 1 sono schematizzati i due metodi che si possono utilizzare per trattare l'espettorato e che forniscono risultati sostanzialmente simili per quanto riguarda la valutazione delle cellule infiammatorie<sup>9</sup>. Entrambi i metodi hanno tuttavia vantaggi e svantaggi: con il metodo che prevede la processazione di tutto il materiale raccolto si evita qualsiasi errore di selezione e si può valutare anche la componente cellulare non intrappolata nel muco ma si ha spesso un'elevata contaminazione salivare; con il metodo della selezione si riduce notevolmente la contaminazione salivare ma si possono fornire risultati scarsamente attendibili se non si presta sufficiente attenzione alla fase di individuazione e selezione dei "plugs".

Lo scopo della processazione del campione è quello di liberare le cellule infiammatorie dal muco che le intrappola, utilizzando degli agenti mucolitici (es: ditiotreitolo) che rompendo la struttura della mucina, principale componente proteica del muco, favoriscono la solubilizzazione del campione. Le cellule quindi vengono raccolte con centrifugazione, lavate con tampone e contaminate. In questa fase viene anche valutata la vitalità cellulare che può fornire informazioni sulla attività del processo infiammatorio nelle vie aeree del paziente: un processo infiammatorio significativo si accompagna ad un elevato e continuo reclutamento cellulare che si traduce in una elevata vitalità delle cellule raccolte nell'espettorato indotto. L'allestimento di vetrini con citospin, la colorazione delle cellule con May Grunwald-Giemsa o Diff-Quick e la lettura al microscopio ottico consentono poi di effettuare la conta differenziale delle cellule infiammatorie presenti nel campione: macrofagi, neutrofilii, eosinofili, linfociti e cellule epiteliali bronchiali. In Figura 2 sono mostrati alcuni esempi di vetrini alle-



stati con cellule di espettorato indotto. Separatamente viene anche fornita la percentuale di cellule squamose che indica il grado di contaminazione salivare del campione. I dati ottenuti sulla cellularità del campione hanno una buona riproducibilità, sia se si confrontano risultati ottenuti nello stesso campione che se si confrontano valutazioni eseguite da diversi esaminatori. La riproducibilità dei dati è abbastanza buona per macrofagi, neutrofili ed eosinofili e leggermente più scarsa per linfociti e cellule epiteliali<sup>10</sup>. Inoltre, soprattutto per quanto riguarda la percentuale di eosinofili, è stata evidenziata una correlazione tra queste cellule nell'espettorato indotto di pazienti con asma lieve-moderato e nel lavaggio bronco alveolare (BAL) e in misura minore anche nelle biopsie bronchiali<sup>11</sup>.

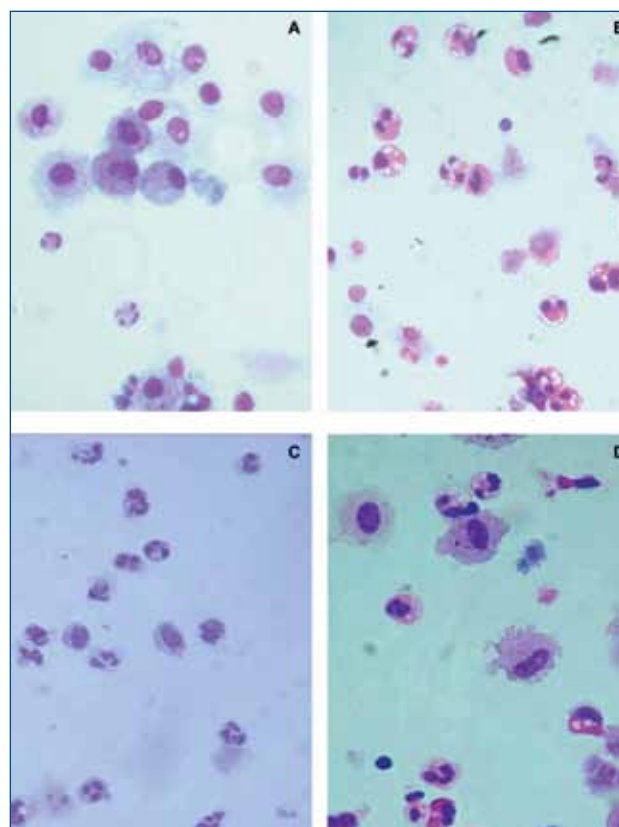
## Valori di normalità delle cellule infiammatorie nell'espettorato indotto

Diversi studi hanno valutato la presenza di cellule infiammatorie nell'espettorato di soggetti sani ma la gran parte di essi ha considerato un numero limitato di soggetti sani confrontati con pazienti affetti da diverse patologie respiratorie. Alcuni studi si sono proposti tuttavia la valutazione dell'espettorato indotto in un consistente numero di soggetti sani allo scopo di fornire va-

lori di riferimento per la cellularità dell'espettorato che possano essere utili nella pratica clinica<sup>12,13</sup>.

**Un soggetto sano ha un espettorato composto principalmente da macrofagi e in misura minore da neutrofili mentre eosinofili, linfociti e cellule epiteliali bronchiali sono presenti in percentuali molto basse.**

Un soggetto sano ha un espettorato composto principalmente da macrofagi e in misura minore da neutrofili mentre eosinofili, linfociti e cellule epiteliali bronchiali sono presenti in percentuali molto basse (Tabella I). Gli studi sui soggetti di controllo sono stati effettuati su una popolazione mediamente giovane ma nella pratica clinica e soprattutto per i soggetti con bronchite cronica ostruttiva (BPCO) si è reso necessario avere valori di riferimento provenienti da una popolazione più anziana. È stato infatti dimostrato che la percentuale di neutrofili nell'espettorato di soggetti sani aumenta con l'età, soprattutto nelle donne, senza una correlazione con la percentuale di neutrofili nel sangue periferico<sup>14</sup>. I soggetti anziani possono quindi avere



**Figura 2.** Esempi rappresentativi di campioni di espettorato indotto. Pannello A: espettorato con macrofagi e neutrofili (controllo sano); pannello B: espettorato con eosinofili (paziente asmatico); pannello C: espettorato con neutrofili (paziente BPCO); pannello D: espettorato con neutrofili ed eosinofili (paziente asmatico).

**Tabella I.** Cellule infiammatorie nell'espettorato di soggetti sani (media  $\pm$  deviazione standard).

Espettorato indotto	Percentuali
Macrofagi	69,2 $\pm$ 13,0
Neutrofilii	27,3 $\pm$ 13,0
Eosinofili	0,6 $\pm$ 0,8
Linfociti	1,0 $\pm$ 1,8
Cellule epiteliali bronchiali	1,5 $\pm$ 1,8

elevate percentuali di neutrofilii, senza la presenza di una sintomatologia bronchiale associata. Questo accumulo di neutrofilii nelle vie aeree determina quella che viene indicata come infiammazione minima persistente che può costituire il terreno fertile per l'instaurarsi di patologie bronchiali/polmonari. Oltre all'età, altri fattori possono determinare un incremento della percentuale di neutrofilii nelle vie aeree, in particolare l'inquinamento atmosferico<sup>15</sup> e l'inquinamento indoor soprattutto da endotossina<sup>16</sup>. Anche il reflusso gastroesofageo, è stato dimostrato causare un incremento del reclutamento dei neutrofilii nelle vie aeree<sup>17</sup>.

In alcuni casi, soprattutto in soggetti con BPCO, il paziente è in grado di produrre espettorato spontaneo, senza la necessità dell'induzione. Alcuni studi hanno confrontato la correlazione tra l'espettorato spontaneo e l'espettorato indotto negli stessi soggetti, trovando i due campioni sostanzialmente simili per quanto riguarda le cellule infiammatorie e sostanzialmente solo una vitalità inferiore e una percentuale di cellule squamose più elevata nell'espettorato spontaneo rispetto all'indotto<sup>18</sup>.

## Applicazioni cliniche dell'espettorato indotto

### Asma

L'asma, essendo una malattia infiammatoria cronica, è stata tra le prime patologie respiratorie per cui si è dimostrata utile la valutazione dell'espettorato indotto. Dal momento in cui si è riconosciuta l'importanza della flogosi in questa patologia, sia nella diagnosi che nel follow-up, l'espettorato indotto ha fornito la caratterizzazione di questa componente infiammatoria altrimenti ottenibile con metodiche più invasive. L'asma è comunemente associata alla presenza di eosinofili nelle vie aeree ma la percentuale di soggetti con asma di tipo eosinofilo varia a seconda degli studi<sup>19,20</sup>.

**L'asma è comunemente associata alla presenza di eosinofili nelle vie aeree.**

Al momento della diagnosi la presenza di eosinofili nell'espettorato può essere utile, soprattutto in quei soggetti con sintomatologia non chiara o con lieve iperreattività bronchiale. Il significato della percentuale

di eosinofili nell'espettorato è stato in un primo tempo correlato alla gravità dell'asma. Louis e colleghi hanno dimostrato che la percentuale di eosinofili nell'espettorato di soggetti asmatici era significativamente più alta rispetto ai controlli e all'interno del gruppo di asmatici l'incremento era maggiore nei soggetti con asma severo rispetto all'asma moderato o intermittente<sup>21</sup>. In altri lavori, la percentuale di eosinofili nell'espettorato era correlata più che al grado di gravità della malattia allo scarso controllo della malattia stessa<sup>22</sup>. Pur essendo l'eosinofilia nell'espettorato un buon indice dell'infiammazione nei soggetti asmatici, spesso la sua correlazione con l'iperreattività bronchiale, soprattutto valutata con il test alla metacolina, è scarsa, ad indicare la dissociazione frequente tra queste due caratteristiche della malattia<sup>23,24</sup>. La causa principale di questa dissociazione è probabilmente da far risalire alla multifattorialità dell'asma che può manifestarsi con fenotipi diversi a seconda del prevalere di una componente piuttosto che dell'altra<sup>19</sup>.

Diversi studi hanno inoltre messo in evidenza l'importanza dell'espettorato indotto nel monitoraggio della terapia con corticosteroidi nei pazienti asmatici, avendo questi farmaci un effetto di riduzione dell'eosinofilia nell'espettorato e di conseguenza dell'infiammazione delle vie aeree. Green e colleghi hanno dimostrato che monitorare il paziente con asma moderato-severo e modulare la terapia farmacologica in base alla presenza di eosinofili nell'espettorato determina una significativa riduzione delle esacerbazioni dell'asma rispetto al numero di esacerbazioni riscontrate nei soggetti seguiti in base alle sole linee guida e alla funzionalità respiratoria<sup>25</sup>. Anche nei bambini asmatici la percentuale di eosinofili nell'espettorato è aumentata rispetto ai bambini sani anche se una parte dei bambini asmatici non presenta evidenze di infiammazione delle vie aeree<sup>26</sup>.

Come sottolineato in precedenza, non tutti i pazienti asmatici presentano un pattern infiammatorio eosinofilo, ci sono infatti soggetti che presentano un'infiammazione di tipo neutrofilico, in alcuni casi associata ad asma grave e resistente alla terapia con gli steroidi<sup>27</sup>.

Una neutrofilia nell'espettorato è stata dimostrata anche in donne con asma ad esordio durante la menopausa, in genere un asma severo, rispetto a donne con asma insorta prima della menopausa e caratterizzata principalmente da un pattern eosinofilo<sup>28</sup>.

L'espettorato indotto viene ampiamente utilizzato anche nella caratterizzazione del paziente con sospetta asma professionale nella valutazione dell'infiammazione bronchiale prima e dopo test di broncostimolazione specifico con la sostanza sospettata di indurre la malattia. Un test di broncostimolazione specifico positivo (caduta del FEV<sub>1</sub> >20% rispetto al valore pre test), che è considerato il "gold standard" per la diagnosi di asma occupazionale, è frequentemente associato ad un incremento della percentuale di eosinofili nell'espettorato dopo test, specialmente se sono in gioco sostanze asmogene ad alto peso

molecolare. Più raramente, e di solito nel caso di sostanze chimiche a basso peso molecolare, dopo test di broncostimolazione specifico positivo si può riscontrare neutrofilia nell'espettorato <sup>29</sup>.

## Bronchite cronica ostruttiva (BPCO)

La metodica dell'espettorato indotto è stata ampiamente utilizzata nella valutazione dell'infiammazione delle vie aeree in soggetti con BPCO. I neutrofili sono le cellule più abbondanti nell'espettorato dei BPCO e la loro percentuale e/o il numero assoluto correla con la caduta del FEV<sub>1</sub> che si riscontra in questi pazienti <sup>30</sup>.

**I neutrofili sono le cellule più abbondanti nell'espettorato dei BPCO.**

Durante l'esacerbazione di malattia, i pazienti vanno di solito incontro ad un ulteriore incremento della percentuale di neutrofili così come ad un aumento della cellularità totale dell'espettorato <sup>31</sup>. La percentuale di neutrofili nell'espettorato è considerata un biomarker con una riproducibilità non estremamente elevata <sup>10</sup>, a causa soprattutto di diversi fattori, anche non legati a condizioni patologiche, che possono determinare un incremento o una variazione di queste cellule nell'espettorato. La percentuale dei neutrofili nell'espettorato dei soggetti con BPCO è stata tuttavia spesso utilizzata come indicatore per valutare la risposta terapeutica antiinfiammatoria di diversi farmaci. In alcuni di questi lavori, la percentuale di neutrofili è rimasta invariata dopo trattamento dei pazienti ad esempio con fluticasone-salmeterolo <sup>32</sup>, in altri studi la neutrofilia nell'espettorato è diminuita dopo fluticasone <sup>33 34</sup> o dopo il trattamento con eritromicina <sup>35 36</sup>, teofillina <sup>37</sup> o roflumilast <sup>38</sup>. Alcuni di questi studi presentano risultati contrastanti che possono essere spiegati sia con l'eterogeneità della malattia che con una certa variabilità nella determinazione dei neutrofili nell'espettorato <sup>10</sup>. Uno studio recente ha dimostrato che l'utilizzo della percentuale dei neutrofili nell'espettorato unita ad altri quattro marcatori biologici valutati sempre nell'espettorato (alfa-1 antitripsina, IL-6, MMP7 e albumina) consentono di ottenere un'ottima riproducibilità tra i campioni valutati in due visite successive sia in soggetti con BPCO che in soggetti sani <sup>39</sup>.

Una parte dei pazienti con BPCO può presentare anche eosinofilia nell'espettorato che in genere predice una buona risposta all'utilizzo dei corticosteroidi sia in condizioni stabili <sup>40</sup> che durante esacerbazione di malattia <sup>31</sup>. Per questo motivo la valutazione dell'espettorato indotto si è rilevata utile allo scopo di fenotipizzare i pazienti con BPCO, soprattutto durante l'esacerbazione. Nello studio di Bafadhel e colleghi, gli autori hanno individuato quattro tipi diversi di esacerbazioni: virale, batterica, eosinofila e non legata all'infiammazione, fenotipi che possono essere utili per adattare meglio la terapia da proporre al paziente <sup>41</sup>. Inoltre il monitoraggio dell'infiammazione tramite la valutazione dell'espettorato indotto del paziente consentirebbe di

predire l'insorgenza di esacerbazioni dopo la sospensione della terapia steroidea <sup>42</sup>.

## Altre malattie infiammatorie delle vie respiratorie

L'espettorato indotto è stato utilizzato, oltre che per l'asma e per la BPCO, anche per lo studio di altre malattie in cui la componente infiammatoria delle vie aeree gioca un ruolo importante.

**L'espettorato indotto è stato utilizzato, oltre che per l'asma e per la BPCO, anche per lo studio di altre malattie in cui la componente infiammatoria delle vie aeree gioca un ruolo importante.**

La bronchite eosinofila è ad esempio una patologia la cui definizione e caratterizzazione è nata proprio a seguito degli studi effettuati con l'espettorato indotto <sup>43</sup>. Infatti soggetti che presentano tosse cronica con buona risposta agli steroidi, con radiografia, funzionalità respiratoria e iperreattività bronchiale aspecifica nella norma, possono avere un'infiammazione bronchiale di tipo eosinofilo che è ben evidenziabile con la valutazione delle cellule dell'espettorato indotto.

La sindrome delle apnee ostruttive notturne è causata da meccanismi ancora in parte sconosciuti ma è stata descritta una relazione con l'infiammazione delle vie aeree. Questi soggetti sono stati studiati con la metodica dell'espettorato indotto ed è stata evidenziata una neutrofilia nell'espettorato <sup>44</sup>.

La fibrosi cistica è un'altra patologia dell'apparato respiratorio in cui la componente infiammatoria delle vie aeree è stata studiata con l'espettorato, sia spontaneo che indotto. Nonostante siano ormai note le mutazioni dei geni responsabili dello sviluppo della malattia, non sono ancora disponibili sufficienti mezzi diagnostici per individuare i soggetti, soprattutto bambini, che possono andare incontro ad una patologia più severa. Casistiche limitate, ma provenienti da diversi centri di ricerca, hanno messo in evidenza una correlazione tra il declino della funzionalità respiratoria di questi pazienti e diversi marcatori biologici valutabili nell'espettorato, soprattutto IL-8, l'elastasi, il numero totale di cellule e i neutrofili dell'espettorato <sup>45</sup>. Livelli elevati di elastasi, enzima presente nel citoplasma dei neutrofili, nell'espettorato di pazienti con fibrosi cistica hanno il più alto valore predittivo per un rapido declino della funzionalità polmonare e la sua determinazione consentirebbe quindi di individuare i soggetti che necessitano di un più rapido intervento terapeutico <sup>46</sup>. Nei pazienti adulti con fibrosi cistica, tra i diversi biomarcatori valutati nell'espettorato, solo livelli elevati di una proteina, l'high mobility group box-1 protein (HMGB-1), predicono l'incidenza e la comparsa di esacerbazioni polmonari acute ed insieme ai livelli nell'espettorato di GM-CSF possono identificare pazienti che hanno un maggior declino della funzionalità respiratoria <sup>47</sup>.

Inflammation delle vie aeree e fibrosi polmonare sono inoltre presenti in diverse malattie che coinvolgono il sistema respiratorio. Tuttavia, nelle patologie interstiziali del polmone il BAL solitamente rappresenta una delle indagini diagnostiche più utilizzate, essendo però una procedura relativamente invasiva diversi studi si sono focalizzati sul confronto BAL ed espettorato indotto allo scopo di ridurre l'invasività delle procedure diagnostiche. In pazienti ad esempio con sclerosi sistemica ad interessamento polmonare, l'espettorato indotto è considerato un metodo non invasivo ed attendibile per la valutazione dei primi segni di alveolite<sup>48</sup>.

Altri studi hanno evidenziato la possibilità che l'espettorato indotto venga utilizzato per studiare precocemente il coinvolgimento polmonare in soggetti con connettiviti associate ad interessamento polmonare<sup>49</sup>.

L'espettorato indotto è stato anche utilizzato per ottenere cellule del sistema immune allo scopo di capire meglio i meccanismi che sottendono a diverse patologie dell'apparato respiratorio. Nella sarcoidosi ad esempio, l'espettorato è in grado di evidenziare l'elevata percentuale di linfociti T CD4 positivi presenti nelle vie aeree di questi soggetti<sup>50</sup> ed in particolare è stato evidenziato un aumento di linfociti T regolatori nell'espettorato di soggetti con sarcoidosi e polmonite da ipersensibilità<sup>51</sup>.

Nella fibrosi polmonare idiopatica, l'espettorato indotto mostra un accumulo di cellule infiammatorie, soprattutto neutrofili, nello spazio alveolare e gli eosinofili anch'essi aumentati si associano al riflesso della tosse<sup>52</sup>.

Soggetti con sindrome di Churg-Strauss presentano un incremento della percentuale di eosinofili nell'espettorato indotto. L'eosinofilia nell'espettorato sembra essere inoltre predittiva di esacerbazioni di malattia<sup>53</sup>.

Work e colleghi hanno evidenziato come l'espettorato possa essere utile nel monitoraggio della componente infiammatoria delle vie aeree associata alla aspergilloso broncopolmonare allergica essendo l'infiltrato eosinofilo e neutrofilico correlato con la severità delle bronchiectasie<sup>54</sup>. Inoltre nello stesso studio, i pazienti con bronchiectasie, soggetti che hanno quindi un incremento della produzione di muco e uno sbilanciamento del sistema di clearance del muco stesso, hanno un accumulo di neutrofili e dei mediatori solubili associati a queste cellule nell'espettorato indotto. In questi soggetti la valutazione di tali mediatori o della stessa neutrofilia può essere utilizzata come risposta al trattamento con diversi farmaci.

**L'espettorato indotto è una metodica non invasiva, di facile esecuzione utile per la valutazione dell'infiammazione nelle vie aeree di diverse patologie respiratorie.**

L'espettorato indotto, associato al test di proliferazione dei linfociti del sangue periferico, si è rilevato utile anche nella diagnostica della berilliosi cronica in cui, i

soggetti esposti al berillio durante la loro attività lavorativa, soprattutto dentisti, presentano un incremento del rapporto dei linfociti CD4/CD8 nell'espettorato maggiore di 2.5, fornendo dati sovrapponibili ad altre indagini più invasive come la biopsia transbronchiale<sup>55</sup>.

In conclusione l'espettorato indotto è una metodica non invasiva, di facile esecuzione se eseguita da personale esperto; fornisce risultati in tempi relativamente rapidi ed è utile per la valutazione dell'infiammazione nelle vie aeree di diverse patologie respiratorie, soprattutto l'asma e la BPCO.

## Bibliografia

- Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, et al. *Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice*. Eur Respir J 2000;16:150-8.
- Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, et al. *Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum*. Eur Respir J 2002;20(Suppl. 37):40s-3s.
- Brightling CE. *Clinical applications of induced sputum*. Chest 2006;129:1344-8.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. *Sputum induction*. Eur Respir J 2002;20(Suppl.37):3s-8s.
- Eftimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, et al. *Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation*. Eur Respir J 2002;20(Suppl.37):19s-23s.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, et al. *Safety of sputum induction*. Eur Respir J 2002;20(Suppl 37):9s-18s.
- Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, et al. *Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum*. Eur Respir J 2002;20(Suppl.37):40s-3s.
- Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, et al. *Sputum induction in children*. Eur Respir J 2002;20(Suppl.37):44s-6s.
- Spanevello A, Beghé B, Bianchi A, et al. *Comparison of two methods of processing induced sputum: selected versus entire sputum*. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:665-8.
- Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, et al. *Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility*. Clin Exp Allergy 1997;27:1138-44.
- 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;27:769-79.
- Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, et al. *Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers*. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1172-4.
- Belda J, Leigh R, Parameswaran K, et al. *Induced sputum cell counts in healthy adults*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:475-8.
- Pignatti P, Ragnoli B, Radaeli A, et al. *Age-related increase of airway neutrophils in older healthy nonsmoking subjects*. Rejuvenation Res 2011;14:365-70.
- Dragonieri S, Musti M, Izzo C, et al. *Sputum induced cellularity in a group of traffic policemen*. Sci Total Environ 2006;367:433-6.
- Rosati JA, Yoneda KY, Yasmeen S, et al. *Respiratory health and indoor air pollution at high elevation*. Arch Environ Occup Health 2005;60:96-105.
- Carpagnano GE, Resta O, Ventura MT, et al. *Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma*. J Intern Med 2006;259:323-31.
- Pizzichini MM, Popov TA, Eftimiadis A, et al. *Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflamma-*

- tion in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:866-9.
- 19 Bhakta NR, Woodruff PG. *Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again*. *Immunol Rev* 2011;242:220-32.
- 20 Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, et al. *Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum*. *Respirology* 2006;11:54-61.
- 21 Louis R, Lau LC, Bron AO, et al. *The relationship between airways inflammation and asthma severity*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:9-16.
- 22 Romagnoli M, Vachier I, Tarodo de la Fuente Pet al. *Eosinophilic inflammation in sputum of poorly controlled asthmatics*. *Eur Respir J* 2002;20:1370-7.
- 23 Crimi E, Spanevello A, Neri M, et al. *Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:4-9.
- 24 Louis R, Sele J, Henket M, et al. *Sputum eosinophil count in a large population of patients with mild to moderate steroid-naive asthma: distribution and relationship with methacholine bronchial hyperresponsiveness*. *Allergy* 2002;57:907-12.
- 25 Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial*. *Lancet* 2002;360 (9347):1715-21.
- 26 Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, et al. *Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity*. *Thorax* 2000;55:768-74.
- 27 Fahy JV. *Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies*. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:256-9.
- 28 Foschino Barbaro MP, Costa VR, Resta O, et al. *Menopausal asthma: a new biological phenotype?*. *Allergy* 2010;65:1306-12.
- 29 Quirce S, Lemièrre C, de Blay F, et al. *Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings*. *Allergy* 2010;65:445-58.
- 30 Stănescu 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;51:267-71.
- 31 Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, et al. *MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation*. *Respir Res* 2005;6:151.
- 32 Barnes NC, Qiu YS, Pavord ID, et al. *Antiinflammatory effects of salmeterol/fluticasone propionate in chronic obstructive lung disease*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:736-43.
- 33 Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Gosman MM, et al. *Effect of fluticasone with and without salmeterol on pulmonary outcomes in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized trial*. *Ann Intern Med* 2009;151:517-27.
- 34 Gan WQ, Man SF, Sin DD. *Effects of inhaled corticosteroids on sputum cell counts in stable chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and a meta-analysis*. *BMC Pulm Med* 2005;5:3.
- 35 He ZY, Ou LM, Zhang JQ, et al. *Effect of 6 months of erythromycin treatment on inflammatory cells in induced sputum and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease*. *Respiration* 2010;80:445-52.
- 36 Seemungal TA, Wilkinson TM, Hurst JR, et al. *Long-term erythromycin therapy is associated with decreased chronic obstructive pulmonary disease exacerbations*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1139-47.
- 37 Ford PA, Durham AL, Russell RE, et al. *Treatment effects of low-dose theophylline combined with an inhaled corticosteroid in COPD*. *Chest* 2010;137:1338-44.
- 38 Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, et al. *Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD*. *Thorax* 2007;62:1081-7.
- 39 Röpcke S, Holz O, Lauer G, et al. *Repeatability of and relationship between potential COPD biomarkers in bronchoalveolar lavage, bronchial biopsies, serum, and induced sputum*. *PLoS One* 2012;7:e46207.
- 40 Leigh R, Pizzichini MM, Morris MM, et al. *Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment*. *Eur Respir J* 2006;27:964-71.
- 41 Bafadhel M, McKenna S, Terry S, et al. *Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers*. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:662-71.
- 42 Liesker JJ, Bathoorn E, Postma DS, et al. *Sputum inflammation predicts exacerbations after cessation of inhaled corticosteroids in COPD*. *Respir Med* 2011;105:1853-60.
- 43 Gibson PG, Fujimura M, Niimi A. *Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment*. *Thorax* 2002;57:178-82.
- 44 Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, et al. *Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome*. *Respir Med* 2004;98:25-8.
- 45 Trapnell BC. *Induced sputum biomarkers for monitoring cystic fibrosis lung disease*. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:812-4.
- 46 Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, et al. *Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:857-65.
- 47 Liou TG, Adler FR, Keogh RH, et al. *Sputum biomarkers and the prediction of clinical outcomes in patients with cystic fibrosis*. *PLoS One* 2012;7:e42748.
- 48 Yilmaz N, Abul Y, Bicakcigil M, et al. *Induced sputum as a method for detection of systemic sclerosis-related interstitial lung disease*. *Rheumatol Int* 2012;32:1921-5.
- 49 Vatrella A, Bocchino M, Perna F, et al. *Induced sputum as a tool for early detection of airway inflammation in connective diseases-related lung involvement*. *Respir Med* 2007;101:1383-9.
- 50 Fireman E, Boikaner T, Priel IE. *Combined CD4/CD8 ratio in induced sputum and pulmonary function testing for non-invasive identification of sarcoidosis*. *Transl Res* 2006;148:87-95.
- 51 Mroz RM, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, et al. *Increased levels of Treg cells in bronchoalveolar lavage fluid and induced sputum of patients with active pulmonary sarcoidosis*. *Eur J Med Res* 2009;14(Suppl. IV):165-9.
- 52 Fireman E, Lerman Y. *Induced sputum in interstitial lung diseases*. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12:318-22.
- 53 Meziane H, Maakel ML, Vachier I, et al. *Sputum eosinophilia in Churg-Strauss syndrome*. *Respir Med* 2001;95:799-801.
- 54 Wark PA, Saltos N, Simpson J, et al. *Induced sputum eosinophils and neutrophils and bronchiectasis severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis*. *Eur Respir J* 2000;16:1095-101.
- 55 Fireman E, Mazor O, Kramer M, et al. *Non-invasive diagnosis of chronic beryllium disease in workers exposed to hazardous dust in Israel*. *Occup Environ Med* 2010;67:631-5.

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.