

Espettorato indotto e fenotipizzazione dei pazienti con malattie ostruttive delle vie aeree

Induced sputum and phenotyping of patients with obstructive airway diseases

Patrizia Pignatti¹, Dina Visca^{2,3}, Antonella Gurrado¹, Francesco Ardesi³, Martina Zappa³, Sara Grossi², Antonio Spanevello^{2,3}

¹ Laboratorio di Immuno-Allergologia Clinica, Istituti Clinici Scientifici Maugeri, IRCCS, Pavia; ² UO di Pneumologia Riabilitativa, Dipartimento di Medicina e Riabilitazione Cardio Respiratoria, Istituti Clinici Scientifici Maugeri, IRCCS, Tradate (VA); ³ Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università degli Studi dell'Insubria, Varese-Como

Riassunto

L'espettorato indotto è una metodica scarsamente invasiva utile per valutare l'infiammazione bronchiale. L'induzione tramite nebulizzazione di soluzione salina ipertonica, favorisce l'accumulo e l'espulsione delle secrezioni che raccolte vengono inviate al laboratorio per la processazione. Gli eosinofili sono solitamente scarsamente rappresentati nell'espettorato di soggetti sani, quando la loro percentuale è $\geq 3\%$, si parla di infiammazione eosinofila. I neutrofili che possono essere aumentati ($\geq 61\%$) come caratteristica infiammatoria della malattia o a seguito di infezioni, inquinamento atmosferico o fumo di sigaretta, caratterizzano il *pattern* neutrofilico. Quando sia gli eosinofili che i neutrofili sono elevati il *pattern* si definisce granulocitico misto. I pazienti asmatici presentano spesso un *pattern* eosinofilo che può essere parzialmente risolto dalla terapia con corticosteroidi inalatori (ICS). Vi sono soggetti che pur asmatici non presentano infiammazione nelle vie aeree, o per efficacia della terapia, o perché la componente di broncocostrizione e l'ispessimento della parete bronchiale risultano le caratteristiche principali; in questo caso il *pattern* è paucigranulocitico. Nei pazienti con asma severo, la terapia con ICS non è sufficiente per controllare la malattia. Se il paziente ha un fenotipo infiammatorio T2 [elevati eosinofili nel sangue e/o nell'espettorato, alti livelli di ossido nitrico esalato (FeNO) e/o IgE], può giovare di terapie con farmaci biologici. Gli eosinofili nel sangue correlano debolmente con quelli dell'espettorato ma tale correlazione è comunque più elevata rispetto a quella con il FeNO.

I pazienti con bronchite cronica ostruttiva (BPCO) hanno solitamente un espettorato mucopurulento caratterizzato da un'elevata percentuale di neutrofili. Un sottogruppo di questi soggetti però può presentare un'infiammazione eosinofila in alcuni casi più evidente nel sangue che nell'espettorato. In conclusione, la valutazione dell'espettorato indotto può essere utile tutte le volte che è necessario fenotipizzare un paziente dal punto di vista dell'infiammazione bronchiale, quando ad esempio c'è una scarsa risposta alla terapia o in pazienti con asma severo.

Parole chiave: espettorato indotto, spontaneo, infiammazione bronchiale, vie aeree, asma, bronchite cronica ostruttiva

Summary

Induced sputum is a minimally invasive methodology useful to evaluate airway inflammation. Sputum induction with the nebulization of a saline hypertonic solution favours accumulation and production of airway sputum. The collected sample is processed with mucolytic agent. Eosinophils are usually scarcely represented in the sputum sample of healthy subjects and when their percentage is $\geq 3\%$, we can define the inflammatory pattern as eosinophilic. Increase of neutrophils ($\geq 61\%$) can be a characteristic of the disease or be induced by infections, pollution or smoking habit and it defines a neutrophilic pattern. When both eosinophils

Ricevuto/Received: 13/04/2023

Accettato/Accepted: 22/04/2023

Corrispondenza

Antonio Spanevello

Istituti Clinici Scientifici Maugeri, via Roncaccio 16, 21049 Tradate (VA)
antonio.spanevello@icsmaugeri.it

Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere nessun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

Come citare questo articolo: Pignatti P, Visca D, Gurrado A, et al. Espettorato indotto e fenotipizzazione dei pazienti con malattie ostruttive delle vie aeree. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2023;38:28-36. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-672>

© Copyright by Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri – Italian Thoracic Society (AIPO – ITS)



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

and neutrophils are high, a mixed granulocytic pattern is defined. Asthmatic patients frequently present an eosinophilic inflammation which can be reduced with inhaled corticosteroid (ICS) therapy. There are asthmatic patients without a significant airway inflammation, either because the inhaled therapy is successful in maintaining low the inflammatory profile or because bronchoconstriction, thickening of the airway wall are the major components of the disease, in this case the inflammatory pattern is defined paucigranulocytic. In severe asthmatic patients, ICS is not sufficient to maintain the control of the disease and if the patient has a T2 endotype (increased blood and or sputum eosinophils or fractional exhaled nitric oxide (FeNO) or high IgE), biologic therapy could be attempted. Blood eosinophils are a modest surrogate evaluation for sputum eosinophils. FeNO levels, which mildly correlate with sputum eosinophils, are high when a T2 pattern is present. Patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), usually have mucopurulent sputum samples with a high percentage of neutrophils. However, in a subgroup of subjects, an eosinophilic airway inflammation with a lower correlation with blood eosinophils has been detected. In conclusion, induced sputum methodology can be useful when the characterization of airway inflammation is needed in order to phenotype patients or to evaluate an insufficient response to therapy.

Key words: induced sputum, spontaneous, bronchial inflammation, airways, asthma, chronic obstructive pulmonary diseases

Introduzione

L'espettorato indotto è una metodica non invasiva utile per valutare l'infiammazione delle vie aeree in soggetti che non espettorano spontaneamente. L'espettorato è composto da zone dense di muco che intrappolano cellule derivanti dalle vie aeree principalmente centrali. L'utilità della metodica è soprattutto da ricercare nella possibilità di valutare la quantità (cellularità totale) e la distribuzione delle cellule infiammatorie soprattutto in pazienti con asma ma anche in soggetti con bronchite cronica ostruttiva (BPCO). Da più di 20 anni la metodica è stata standardizzata da linee guida della Società Europea di Pneumologia (ERS) ¹, sia per quanto concerne la fase di induzione che per quella di processazione. Le linee guida GINA per l'asma riportano la metodica dell'espettorato indotto come utile nel fenotipizzare dal punto di vista dell'infiammazione il paziente asmatico soprattutto con asma grave ². La fase di induzione viene in genere effettuata in un ambulatorio di broncostimolazione e il materiale viene poi inviato al laboratorio per la processazione. La metodica tuttavia non ha avuto un'elevata diffusione nei laboratori di *routine* ed è rimasta limitata a pochi centri specializzati. Mentre le varie fasi della metodica sono rimaste sostanzialmente invariate dalla pubblicazione delle linee guida ERS ¹, sono invece notevolmente aumentate negli anni le informazioni che si sono ottenute da questo campione. Infatti, oltre alla conta delle cellule infiammatorie, diversi mediatori solubili sono stati valutati nel surnatante dell'espettorato processato così come microRNA, esosomi, analisi di metabolomica e proteomica, valutazioni del microbioma e analisi genetiche.

Fase di induzione

Questa fase è necessaria quando il paziente, soprattutto se asmatico, non è in grado di produrre spontaneamente espettorato. Per questo si ricorre alla nebulizzazione di una soluzione salina ipertonica a concentrazione crescente di cloruro di sodio (2, 3, 4,

5%) o alla nebulizzazione di una soluzione salina ipertonica a concentrazione costante (4,5%). Le fasi di inalazione della nebbia ipertonica sono solitamente quattro da 5 minuti ciascuna intervallata da misurazioni della funzionalità polmonare ³. La soluzione salina ipertonica favorisce la raccolta dell'espettorato nelle vie aeree e quindi la sua espulsione tramite la tosse, allo stesso tempo però potrebbe indurre una broncocostrizione in soggetti predisposti, quindi per sicurezza il paziente viene trattato prima dell'inizio della procedura con broncodilatatore (solitamente salbutamolo 200 o 400 mg), la funzionalità respiratoria viene quindi valutata e monitorata a termine di ogni periodo di induzione. In caso il soggetto vada incontro a broncocostrizione (caduta del FEV₁ ≥ 20%), l'induzione viene immediatamente interrotta e il paziente trattato ulteriormente con broncodilatatore. Nei pazienti con FEV₁ basale dopo broncodilatatore < 60% del predetto la soluzione salina ipertonica viene sostituita con quella isotonica (0,9%) per evitare il rischio di broncocostrizione. Non sono invece noti dati sulla sicurezza della metodica in pazienti con FEV₁ < 1L o < 50% del predetto ⁴. Dopo ogni periodo di inalazione il paziente viene invitato a tossire e ad espettorare. Il materiale viene raccolto in un contenitore sterile, conservato a 4 °C e inviato al laboratorio entro due ore dalla raccolta. 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. La strumentazione viene disinfettata dopo ogni induzione; la presenza di filtri evita la possibilità di contaminazione delle porzioni non monouso dello strumento. Durante la fase di induzione e dopo gli accessi di tosse che aiutano il paziente ad espettorare si genera un aerosol potenzialmente pericoloso soprattutto considerando la possibilità di diffusione di virus. Per questo durante le fasi di picco della recente pandemia causata da SARS-CoV-2, queste manovre sono state prima sospese e poi gradualmente reintrodotte con una serie di precauzioni che prevedono la valutazione del paziente (sintomi ed eventualmente tampone) così come la disinfezione dei

locali in cui si esegue l'induzione e la raccolta nell'espettorato. Un consenso sulle condizioni di sicurezza e la selezione dei pazienti durante la diffusione del virus, pubblicato da esperti internazionali, riassume tutte le precauzioni necessarie per eseguire l'induzione, evitando la diffusione di SARS-CoV-2 ⁵.

L'induzione può essere effettuata anche in bambini con più di 6 anni con una relativa sicurezza e probabilità di successo. Gli studi sui bambini provengono soprattutto dall'estero e hanno mostrato che il pre-trattamento anche in questo caso con broncodilatatore riduce notevolmente la possibilità di broncoostruzione con circa il 6% dei bambini sottoposti ad induzione che ha riportato una caduta del FEV₁ del 10% ⁶.

Processazione

Una volta giunto in laboratorio il campione può essere processato in toto o selezionando i "plugs", le zone più dense di materiale che derivano dalle vie aeree. I metodi sono entrambi accettati dalle linee guida dell'ERS e presentano piccole differenze ⁷. Il primo metodo è più rapido ma ha lo svantaggio che la saliva presente nel campione diluisce il materiale e quando la percentuale di cellule epiteliali squamose, che rappresentano la contaminazione salivare, è > 20%, la riproducibilità della conta delle cellule infiammatorie si riduce. Il metodo di selezione dei "plugs", pur essendo leggermente più indaginoso e pur richiedendo in alcuni casi l'aiuto del microscopio invertito per individuare l'accumulo di cellule infiammatorie nei piccoli "plugs", consente di avere un materiale meno contaminato dalla saliva, una conta cellulare più rapida e una concentrazione dei biomarcatori nel surnatante dell'espettorato scarsamente diluita dalla saliva. Una volta selezionato, il materiale viene trattato con ditione, un agente riducente che rompendo i ponti disolfuro della mucina, la principale proteina del muco, consente la liberazione delle cellule intrappolate nella trama di muco. Il campione viene quindi centrifugato e risospeso in tampone fosfato con l'aggiunta di proteine (albumina bovina o siero fetale). La cellularità totale viene determinata al microscopio ottico con una camera contaglobuli (Burker o Neubau) in quanto la conta automatizzata delle cellule nel campione di espettorato si è rilevata poco affidabile. La vitalità del campione viene valutata con il colorante Trypan blu che entra solo nelle cellule con membrana danneggiata. Un'elevata cellularità, soprattutto se accompagnata da un'elevata vitalità, è indice di un rapido reclutamento delle cellule infiammatorie nelle vie aeree. La conta differenziale delle cellule viene effettuata allestendo un citospin che può essere colorato con

May-Grunwald Giemsa o Diff-Quick. Il blue di toluidina può essere utilizzato per la colorazione di cellule metacromatiche (mastociti e basofili), mentre l'Oil Red per valutare inclusioni citoplasmatiche di natura lipidica presenti soprattutto nei macrofagi e il PERLS per le inclusioni di emosiderina. La conta differenziale al microscopio ottico si effettua contando almeno 400 cellule non squamose, quest'ultime vengono contate a parte come indice della contaminazione salivare del campione.

Valori di normalità e pattern infiammatori

L'espettorato di un soggetto sano è in genere costituito da macrofagi (69,2 ± 13,0%) e neutrofili (27,3 ± 13,0%), mentre eosinofili (0,6 ± 0,8%), linfociti (1,0 ± 1,2%) e cellule epiteliali (1,0 ± 1,2%) sono scarsamente rappresentati ⁸. La riproducibilità del test è buona, almeno per quanto riguarda macrofagi, neutrofili ed eosinofili ⁹. La percentuale di eosinofili e neutrofili del campione è stata utilizzata per definire dei *pattern* infiammatori specifici. Per quanto riguarda gli eosinofili 3% è considerato il *cut-off* per definire un incremento significativo rispetto ai soggetti sani. Per i neutrofili invece le percentuali variano notevolmente a seconda degli studi da 40 a 76%. È stato dimostrato in diversi studi che nei soggetti sani l'invecchiamento determina un incremento dei neutrofili nelle vie aeree, non accompagnato dallo stesso incremento nel sangue. Tale incremento potrebbe essere la conseguenza della ridotta capacità immunologica dell'anziano di contrastare infezioni e altri *trigger* e determinerebbe una sorta di infiammazione minima persistente che potrebbe favorire, in soggetti predisposti, l'instaurarsi di patologie respiratorie ¹⁰. Considerato che l'incremento dell'età si associa anche nei soggetti sani ad un incremento dei neutrofili nelle vie aeree e che diversi fattori tra cui il fumo o lo smog possono aumentare il reclutamento di queste cellule nei bronchi, diversi studi considerano il 61% come *cut-off* significativo per un'infiammazione neutrofilica. In Tabella I sono indicati i vari *pattern* infiammatori e relativi *cut-off*.

Tabella I. *Pattern* infiammatori valutati con l'espettorato indotto.

Pattern	Eosinofili	Neutrofili
Eosinofilico	≥ 3%	< 61%
Neutrofilico	< 3%	≥ 61%
Granulocitico misto	≥ 3%	≥ 61%
Paucigranulocitico	< 3%	< 61%

Utilità clinica

Asma

I pazienti asmatici presentano molto frequentemente un *pattern* infiammatorio eosinofilo conseguenza di un endotipo T2¹¹. Questi pazienti sono caratterizzati solitamente uno switch dei linfociti T verso il fenotipo Th2 e l'attivazione di linfociti ILC2 coinvolti nell'immunità innata¹². Un gruppo inferiore di pazienti invece presenta un incremento dei neutrofili nelle vie aeree, in alcuni casi si tratta di pazienti con comorbidità come reflusso gastroesofageo, diabete e/o obesità¹³⁻¹⁵. Infezioni ricorrenti, soprattutto batteriche, inoltre, favoriscono un accumulo nelle vie aeree di neutrofili così come l'esposizione ad inquinanti ambientali o il fumo di sigaretta^{16,17}. Mentre nel *pattern* eosinofilo, il paziente asmatico presenta frequentemente un incremento anche degli eosinofili nel sangue e in alcuni casi un aumento del FeNO, nei pazienti con *pattern* neutrofilico, la valutazione dell'espettorato rappresenta un'opportunità unica di caratterizzare l'infiammazione locale che frequentemente non si accompagna a variazioni dei neutrofili nel sangue. La valutazione dell'infiammazione tramite espettorato indotto, essendo effettuata in pochi centri specializzati, viene riservata a pazienti con asma grave e utilizzata allo scopo di definire il *pattern* infiammatorio del paziente prima dell'inizio della terapia con biologici. In alcuni casi, l'espettorato indotto può essere utile anche in pazienti con asma moderato soprattutto in caso di scarsa risposta alla terapia. Il paziente in terapia con corticosteroidi inalatori (ICS) in genere presenta una progressiva diminuzione della componente eosinofila nell'espettorato essendo queste cellule responsive al trattamento con ICS. La permanenza o in alcuni casi l'aumento degli eosinofili dopo l'inizio della terapia può far sospettare una scarsa aderenza del paziente alla terapia stessa, soprattutto se gli eosinofili nell'espettorato presentano un'elevata vitalità, oppure la loro presenza può suggerire un dosaggio dell'ICS insufficiente per il controllo dell'infiammazione. In pazienti con asma severo, la rinosinusite cronica con poliposi nasale è l'unica comorbidità che in analisi multivariata è associata all'eosinofilia nelle vie aeree (OR = 16,2)¹⁸. In pazienti con asma severo refrattario seguiti per tre anni, gli eosinofili ripetuti in media 10 volte per paziente, sono rimasti elevati nell'espettorato della quasi totalità dei pazienti¹⁹. Pazienti con variazioni significative della percentuale di eosinofili durante il *follow-up*, hanno mostrato una riduzione dei flussi espiratori con una più elevata ostruzione e reversibilità e soprattutto un elevato numero di riacutizzazioni nonostante la terapia inalatoria ICS/LABA rispetto ai pazienti con percentuali di eosinofili persistentemente alti, ad indicare che un aumento si-

gnificativo degli eosinofili nell'espettorato potrebbe essere un *trigger* per la riacutizzazione dell'asma^{20,21}. Il trattamento con steroidi per via orale è in grado in pazienti con asma severo refrattario di ridurre l'infiammazione eosinofila nelle vie aeree, sia in termini di eosinofili che di IL-5 nell'espettorato, allo stesso tempo il trattamento può determinare anche una riduzione di IL-8, solitamente associata ad infiammazione neutrofilica²².

I pazienti con asma severo che vengono indirizzati alla terapia con farmaci biologici, anti IL-5, anti IL5R, anti IgE, anti IL-4R o anti TSLP, nella gran parte dei casi presentano una rapida riduzione degli eosinofili nel sangue mentre la riduzione degli eosinofili nell'espettorato si realizza più lentamente e in alcuni casi non efficacemente²³. Pazienti *non responder* alla terapia con anti IL-5, possono presentare una eosinofiloipoesi direttamente a livello bronchiale che alimenta l'infiammazione locale, indipendentemente dagli eosinofili midollari²³, quindi la valutazione degli eosinofili nell'espettorato in questi pazienti risulta l'unica possibilità per dimostrare l'effettiva efficacia del trattamento terapeutico.

Le fluttuazioni invece dei neutrofili nell'espettorato sembrano essere meno associate alle riacutizzazioni. In pazienti asmatici il *pattern* granulocitico misto, quello cioè caratterizzato da incremento sia degli eosinofili che dei neutrofili, in studi trasversali, sembra legato ad un incremento dell'età dei pazienti²⁴, mentre in studi di follow-up a tre anni sembra essere associato ad una maggior caduta del FEV₁ al termine dello studio²⁰.

Pazienti asmatici con un *pattern* infiammatorio paucigranulocitico non dovrebbero giovare di ulteriori incrementi della terapia con ICS, se stabili, potrebbero essere i pazienti candidati ad uno step down di steroide inalatorio²⁵. In caso invece di scarso controllo della malattia l'aggiunta di un anticolinergico a lunga durata d'azione (LAMA) potrebbe essere un'opzione da valutare nei soggetti con una scarsa infiammazione nelle vie aeree². Un'altra applicazione dell'espettorato indotto nell'asma è la valutazione dei pazienti con asma professionale. L'analisi può essere effettuata prima e dopo un *challenge* specifico in cabina con la sostanza sospettata di indurre asma professionale. Diversi studi hanno dimostrato come nei pazienti con questo tipo di patologia, la caduta del FEV₁ ($\geq 20\%$) dopo *challenge*, si accompagna ad un incremento degli eosinofili nell'espettorato indotto 24 ore dopo il *challenge*. In alcuni casi, pur non verificandosi la caduta del FEV₁, che rappresenta il "gold standard" per la diagnosi di asma professionale, l'incremento degli eosinofili riscontrato dopo il *challenge* può far fare diagnosi di bronchite eosinofila occupazionale²⁶. In caso di impossibilità ad eseguire il *challenge* in cabina, la valutazione degli eosinofili nell'e-

spettorato può essere fatto dopo un periodo lavorativo e i risultati confrontati con l'analisi effettuata dopo un periodo di riposo.

BPCO

Il paziente con BPCO produce in genere abbondanti quantità di espettorato e spesso è sufficiente ricorrere alla valutazione dell'espettorato spontaneo invece di indurre l'espettorazione con la nebulizzazione della soluzione salina ipertonica. La qualità del campione spontaneo può essere inferiore soprattutto per quanto riguarda la vitalità cellulare e la presenza di cellule squamose, ma studi di comparazione tra espettorato spontaneo e indotto effettuati negli stessi pazienti hanno mostrato sostanzialmente dati confrontabili per quanto riguarda la percentuale di eosinofili e neutrofilo ²⁷. Da alcuni anni ormai è stato dimostrato che una quota, circa il 30%, dei pazienti con BPCO presenta un'inflammatione eosinofila nelle vie aeree mentre il restante dei pazienti presenta un notevole incremento dei neutrofilo e della cellularità totale del campione. A differenza però dei pazienti asmatici, nei pazienti con BPCO la correlazione tra eosinofili nelle vie aeree ed eosinofili nel sangue risulta essere inferiore, con una quota di pazienti

che presenta più elevati eosinofili nel sangue rispetto ai bronchi, in alcuni casi correlati alla presenza di ipertensione e comorbidità cardiovascolari ²⁸. Nei pazienti con BPCO, la presenza di eosinofili nell'espettorato è indice di una risposta al trattamento con ICS ²⁹ e pazienti con BPCO di varia gravità valutati retrospettivamente presentavano una minor dispnea, minor compromissione respiratoria e un minor uso di ICS se avevano un profilo infiammatorio nelle vie aeree eosinofilo ³⁰.

Eosinofili nell'espettorato verso altri marcatori di infiammazione T2

Gli eosinofili nell'espettorato indotto sono una valutazione scarsamente invasiva dell'inflammatione bronchiale. Tuttavia, essendo la metodica fattibile solo in centri specializzati, diversi studi hanno cercato di validare biomarcatori che potessero riflettere l'inflammatione eosinofila bronchiale. Certamente tra questi, gli eosinofili nel sangue sono la misurazione più semplice e meno costosa da effettuare. La valutazione degli eosinofili nel sangue rappresenta una finestra facilmente disponibile per monitorare il passaggio degli eosinofili dal midollo al sito infiammatorio. In aggiunta agli eosinofili nel sangue periferico, la valutazione del FeNO,

Tabella II. Valori di *cut-off* degli eosinofili nel sangue periferico predittivi di eosinofilia nelle vie aeree (eosinofili nell'espettorato). In tabella sono riportati il numero e le caratteristiche dei pazienti asmatici analizzati negli studi.

Ref.#	Pazienti asmatici adulti	Fumatori	ICS	Cut-off eosinofilia periferica predittiva di eosinofilia bronchiale (≥ 2,5 % o 3,0%)	Sens-Spec%
31	Asma non controllato (n = 75)	sì	sì	1,5%	61,5-78,3
		no	no	≥ 150/mm ³	95,0-29,0
				≥ 200/mm ³	95,0-29,0
				≥ 250/mm ³	68,0-57,0
				≥ 300/mm ³	68,0-57,0
≥ 350/mm ³	42,0-86,0				
43	Asma lieve-moderato (n = 124)	no	sì	≥ 150/mm ³	97,0-27,0
				≥ 200/mm ³	97,0-36,0
				≥ 250/mm ³	85,0-91,0
				≥ 300/mm ³	85,0-91,0
				≥ 350/mm ³	54,0-100,0
44	Asma moderato-severo (n = 110)	no	sì	270/mm ³	78,0-91,0
32	Asma insorto da adulti (n = 336)	sì	sì	90/mm ³	96,0-26,0
				410/mm ³	36,0-95,0
34	Asma non controllato (n = 47)	sì	sì	145/ mm ³ 2%	94,0-89,0 87,0-86,0
45	Asma non controllato (n = 164)	no	sì	2,7% 260/mm ³	92,2-75,8
46	Asma (n = 508)	sì	sì	220/mm ³	77,0-70,0
47	Asma stabile (n = 232)	sì	sì	200/mm ³	85,0-57,0
				2,5%	81,0-59,0

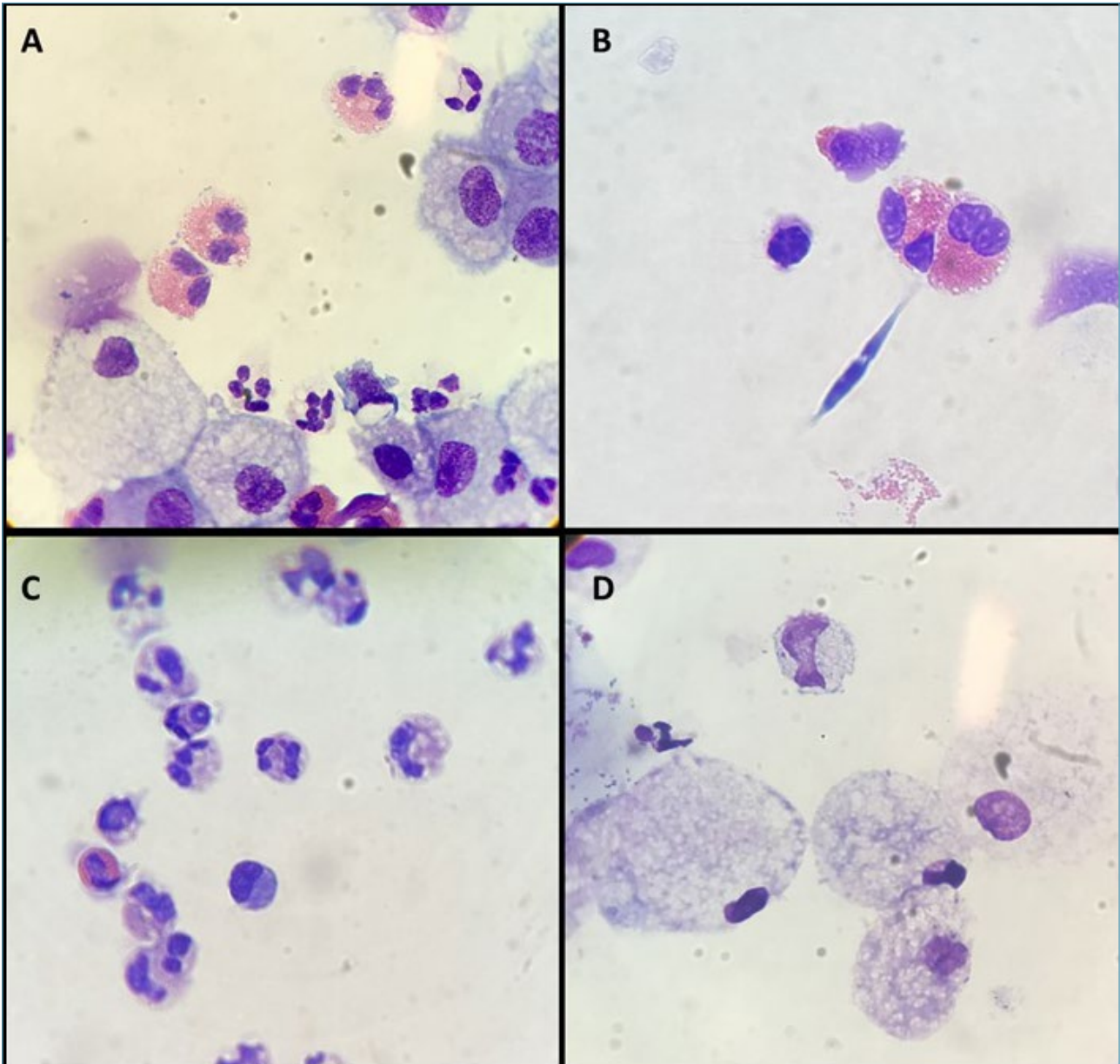


Figura 1. L'immagine mostra quattro citospin di espettorati. Nel pannello A un campione con diversi eosinofili, nel pannello B un cristallo di Charcot-Layden ed alcuni eosinofili, nel pannello C neutrofili ed un eosinofilo e nel pannello D macrofagi con citoplasma schiumoso presenti in alcuni casi in pazienti con reflusso gastro-esofageo.

prodotto dall'ossido nitrico sintetasi inducibile, pur essendo dipendente da IL-13 e non da IL-5 come gli eosinofili nell'espettorato, può indicare uno *switch* T2 dell'infiammazione bronchiale. Sia gli eosinofili nel sangue che il FeNO correlano, anche se debolmente, con gli eosinofili nell'espettorato in pazienti con asma non controllato³¹. In pazienti asmatici indipendentemente dal fenotipo, ad esempio con asma severo, non atopico, obesi e fumatori, gli eosinofili nel sangue e il FeNO hanno paragonabile valore predittivo sull'eosinofilia nell'espettorato, più elevato rispetto al valore predittivo delle IgE totali nel sangue³². Anche la periostina nel sangue, *marker* T2 così come le IgE totali non hanno

mostrato una sufficiente sensibilità e specificità nel predire l'infiammazione nelle vie aeree³³. In pazienti asmatici fumatori, gli eosinofili nel sangue hanno mostrato il più elevato valore predittivo dell'eosinofilia bronchiale nell'espettorato rispetto a FeNO, periostina sierica, IgE e IL-13³⁴. In Tabella II sono riassunti alcuni dei *cut-off* per gli eosinofili nel sangue e le percentuali di sensibilità e specificità nel predire la presenza di eosinofili nell'espettorato ($\geq 2,5$ o 3%).

Limiti e nuove valutazioni nell'espettorato

Ad oggi la cellularità dell'espettorato è l'unico biomar-

catore dell'espettorato con riconosciuta validità clinica. Numerosi studi sono stati effettuati negli anni per poter individuare ulteriori biomarcatori in questo campione biologico. Molte citochine e molecole proinfiammatorie sono state dosate nel surnatante dell'espettorato. Oltre ai costi di queste valutazioni, bisogna considerare e valutare sempre il possibile effetto del DTT usato nella processazione che può danneggiare anche i biomarcatori che si vogliono studiare o gli anticorpi utilizzati negli *immunoassays* per dosarli. Nei casi in cui l'effetto dannoso sia dimostrato, l'espettorato dovrebbe essere processato con tampone fosfato senza DTT. Anche la temperatura di processazione deve essere valutata per ridurre l'attivazione di proteasi presenti nelle cellule dell'espettorato, soprattutto nei neutrofili, che possono danneggiare i biomarcatori solubili. L'aggiunta di un *cocktail* di inibitori di proteasi al campione può essere utile nel mantenere l'integrità delle molecole che si vogliono valutare³⁵. Recentemente è stato pubblicato uno studio in cui il DTT è stato sostituito con perossido d'idrogeno che funziona da substrato per la catalasi presente nei neutrofili dell'espettorato. Da questa reazione si sviluppa molto velocemente ossigeno sotto forma di bolle che facilitano la dispersione dei "plug" nel campione. Nell'espettorato oltre alle cellule possono essere valutati i cristalli di Charcot-Layden (Fig. 1) che derivano dalla cristallizzazione della galectina 10 che fuoriesce dagli eosinofili. Alcuni studi mostrano che la presenza di questi cristalli in alcuni campioni di espettorato correla con la presenza nel paziente di rinosinusite cronica con poliposi³⁶. Recentemente ulteriori valutazioni come microRNA³⁷, *extracellular trap*³⁸, esosomi³⁹, etc., sono state effettuate su campioni di espettorato indotto così come studi di metabolomica che hanno mostrato profili metabolici differenti in pazienti con *pattern* infiammatori diversi⁴⁰. L'analisi proteomica dei campioni di espettorato ha mostrato la possibilità di individuare diversi *cluster* di pazienti all'interno dei classici fenotipi infiammatori⁴¹. Anche il microbioma presente nell'espettorato di pazienti asmatici si è visto variare a seconda del tipo di infiammazione e della gravità e stabilità della malattia⁴².

Conclusioni

Numerosi anni sono ormai passati dalla standardizzazione della metodica dell'espettorato indotto. Certamente questo tipo di valutazione non rientra nel percorso diagnostico del paziente asmatico come indagine utile per la diagnosi. La valutazione dell'infiammazione bronchiale tramite espettorato indotto può però essere utile per definire il *pattern* infiammatorio del paziente, soprattutto se con asma non controllato o con asma

severo. Inoltre, le numerose applicazioni della metodica con nuove valutazioni in termini di biomarcatori, esosomi, vescicole con frammenti di RNA, metabolomica etc., forniranno nel futuro ulteriori caratterizzazioni dei pazienti asmatici o con BPCO utili anche a scopo terapeutico.

Bibliografia

- Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:1s-2s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00000102>
- Global Initiative for Asthma. 2022 GINA report, global strategy for asthma management and prevention (2022 update). Available from: <https://ginasthma.org/gina-reports>.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:3s-8s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00000302>
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, et al. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:9s-18s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00000902>
- Crespo-Lessmann A, Plaza V; Consensus Group. Multidisciplinary consensus on sputum induction biosafety during the COVID-19 pandemic. *Allergy* 2021;76:2407-2419. <https://doi.org/10.1111/all.14697>
- Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:44s-6s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00004402>
- Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:19s-23s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00001902>
- 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;162:1172-1174. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.9908057>
- Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1138-1144.
- Pignatti P, Ragnoli B, Radaeli A, et al. Age-related increase of airway neutrophils in older healthy nonsmoking subjects. *Rejuvenation Res* 2011;14:365-370. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1150>
- Wenzel SE. Severe adult asthmas: integrating clinical features, biology, and therapeutics to improve outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;203:809-821. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3631CI>
- Verma M, Verma D, Alam R. Role of type-2 innate lymphoid cells (ILC2s) in type-2 asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2022;22:29-35. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000798>
- Simpson JL, Baines KJ, Ryan N, et al. Neutrophilic asthma is characterised by increased rhinosinusitis with sleep disturbance and GERD. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2014;32:66-74. <https://doi.org/10.12932/AP0322.32.1.2014>

- 14 Scott HA, Ng SH, McLoughlin RF, et al. Effect of obesity on airway and systemic inflammation in adults with asthma: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2023;thoraxjnl-2022-219268. <https://doi.org/10.1136/thorax-2022-219268>
- 15 Sesma JI, Weitzer CD, Livraghi-Butrico A, et al. UDP-glucose promotes neutrophil recruitment in the lung. *Purinergic Signal* 2016;12:627-635. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9524-5>
- 16 Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:144-150. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32834f0e2a>
- 17 Bessa V, Tseliou E, Bakakos P, et al. Noninvasive evaluation of airway inflammation in asthmatic patients who smoke: implications for application in clinical practice. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;101:226-232; quiz 232-4, 278. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60485-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60485-1)
- 18 Novelli F, Bacci E, Latorre M, et al. Comorbidities are associated with different features of severe asthma. *Clin Mol Allergy* 2018;16:25. <https://doi.org/10.1186/s12948-018-0103-x>
- 19 Dente FL, Latorre M, Novelli F, et al. Can sputum eosinophilia be a constant feature in severe refractory asthmatics? A 3-year longitudinal study. *Int Arch Allergy Immunol* 2015;166:287-290. <https://doi.org/10.1159/000381853>
- 20 Hastie AT, Mauger DT, Denlinger LC, et al. Mixed sputum granulocyte longitudinal impact on lung function in the severe asthma research program. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;203:882-892. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3713OC>
- 21 Louis RE, Schleich FN. Granulocytic airway inflammation and clinical asthma outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;203:797-799. <https://doi.org/10.1164/rccm.202102-0356ED>
- 22 Dente FL, Bacci E, Bartoli ML, et al. Effects of oral prednisone on sputum eosinophils and cytokines in patients with severe refractory asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:464-470. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.04.003>
- 23 Bhalla A, Mukherjee M, Nair P. Airway eosinophilopoietic and autoimmune mechanisms of eosinophilia in severe asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 2018;38:639-654. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.06.003>
- 24 Pignatti P, Visca D, Zappa M, et al. Analysis of patients with asthma and mixed granulocytic inflammatory pattern in sputum. *Respiration* 2022;101:1121-1130. <https://doi.org/10.1159/000527125>
- 25 Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-1721. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11679-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11679-5)
- 26 Quirce S, Lemièrre C, de Blay F, et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy* 2010;65:445-458. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02274.x>
- 27 Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:866-869. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.4.8887576>
- 28 Pignatti P, Visca D, Cherubino F, et al. Do blood eosinophils strictly reflect airway inflammation in COPD? Comparison with asthmatic patients. *Respir Res* 2019;20:145. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1111-1>
- 29 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02872-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02872-5)
- 30 Bartoli ML, Latorre M, Vagaggini B, et al. Are sputum eosinophils associated with a different phenotype in COPD patients? A retrospective study. *Respir Med* 2021;190:106672. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2021.106672>
- 31 Gao J, Wu F. Association between fractional exhaled nitric oxide, sputum induction and peripheral blood eosinophil in uncontrolled asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018;14:21. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0248-7>
- 32 Westerhof GA, Korevaar DA, Amelink M, et al. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes. *Eur Respir J* 2015;46:688-696. <https://doi.org/10.1183/09031936.00012415>
- 33 Pavlidis S, Takahashi K, Ng Kee Kwong F, et al.; on behalf of the U-BIOPRED Study Group. "T2-high" in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *Eur Respir J* 2019;53:1800938. <https://doi.org/10.1183/13993003.00938-2018>
- 34 Papathanasiou E, Bakakos P, Hillas G, et al. Diagnostic accuracy of T2 biomarkers for the prediction of airway eosinophilia in treated smoking asthmatic patients with loss of asthma control. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8:385-387. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.05.052>
- 35 Kelly MM, Leigh R, Carruthers S, et al. Increased detection of interleukin-5 in sputum by addition of protease inhibitors. *Eur Respir J* 2001;18:685-691. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00098501>
- 36 Fahy JV, Locksley RM. Making asthma crystal clear. *N Engl J Med* 2019;381:882-884. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1908064>
- 37 Gomez JL, Chen A, Diaz MP, et al. A network of sputum microRNAs is associated with neutrophilic airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;202:51-64. <https://doi.org/10.1164/rccm.201912-2360OC>
- 38 Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology* 2016;21:467-475. <https://doi.org/10.1111/resp.12730>
- 39 Sánchez-Vidaurre S, Eldh M, Larssen P, et al. RNA-containing exosomes in induced sputum of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1459-1461.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.035>
- 40 Liu Y, Zhang X, Zhang L, et al. Sputum metabolomic profiling reveals metabolic pathways and signatures associated with inflammatory phenotypes in patients with asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2022;14:393-411. <https://doi.org/10.4168/aaair.2022.14.4.393>
- 41 Schofield JPR, Burg D, Nicholas B, et al. Stratification of asthma phenotypes by airway proteomic signatures. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:70-82. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.03.013>

- ⁴² Abdel-Aziz MI, Vijverberg SJH, Neerincx AH, et al. A multi-omics approach to delineate sputum microbiome-associated asthma inflammatory phenotypes. *Eur Respir J* 2022;59:2102603. <https://doi.org/10.1183/13993003.02603-2021>
- ⁴³ Alvarez Puebla MJ, Aroabarren Aleman E, Corcuera Garcia A, et al. Blood eosinophils, fraction of exhaled nitric oxide, and serum eosinophil cationic protein as surrogate markers for sputum eosinophils in asthma: influence of treatment with inhaled corticosteroids. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018;28:210-212. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0246>
- ⁴⁴ Wagener AH, de Nijs SB, Lutter R, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax* 2015;70:115-120. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205634>
- ⁴⁵ Zhang XY, Simpson JL, Powell H, et al. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1137-1145. <https://doi.org/10.1111/cea.12345>
- ⁴⁶ Schleich FN, Manise M, Sele J, et al. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med* 2013;13:11. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-13-11>
- ⁴⁷ Shi B, Li W, Hao Y, Dong H, et al. Characteristics of inflammatory phenotypes among patients with asthma: relationships of blood count parameters with sputum cellular phenotypes. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2021;17:47. <https://doi.org/10.1186/s13223-021-00548-z>