

Utilizzo della misura di ossido nitrico nell'aria espirata: un update

Exhaled nitric oxide measurement: an update

Fabio L.M. Ricciardolo¹, Silvia Stufano², Vitina Carriero¹, Mauro Maniscalco²

¹ Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Centro di Asma Grave e Malattie Rare del Polmone AOU, San Luigi, Orbassano, Università di Torino, Torino; ² Istituti Clinici Scientifici Maugeri, IRCCS, Divisione di Pneumologia Telese Terme (BN)

Riassunto

L'ossido nitrico (NO) è una molecola gassosa che funge da mediatore chiave in numerosi processi fisiologici fondamentali per il nostro organismo. Dalla scoperta della presenza dell'NO nell'esalato umano, ad opera di Gustafsson e collaboratori nel 1991, la ricerca in questo ambito si è notevolmente evoluta fino ad identificarlo come possibile marcatore diagnostico per le malattie dell'apparato respiratorio ed in particolare per l'asma. La procedura di misurazione della concentrazione frazionale dell'NO esalato (FeNO) è stata definita e standardizzata in un documento congiunto dell'American Thoracic Society (ATS) e della European Respiratory Society (ERS) e ad oggi rappresenta una metodologia non invasiva che consente di determinare l'infiammazione delle vie aeree. Nell'asma la misurazione del FeNO correla con altri marcatori di infiammazione di tipo T2, quali gli eosinofili del sangue e dell'espettorato ed insieme ad essi viene utilizzato per descrivere diversi fenotipi di asma. Sono stati identificati valori soglia di FeNO per adulti e bambini asmatici, che possono indicare la mancata aderenza del paziente al trattamento, una possibile risposta positiva al trattamento con corticosteroidi inalatori (ICS) e suggerire la necessità di iniziare un trattamento con ICS. Inoltre essendo il FeNO marcatore di infiammazione T2, esso può predire una risposta positiva al trattamento con biologici. In asmatici gravi trattati con alte dosi di ICS, FeNO ≥ 25 ppb rappresenta un indicatore di efficacia terapeutica del dupilumab.

L'utilizzo dei valori di FeNO nello studio di altre patologie come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e la bronchite eosinofila non asmatica appare ancora controverso, sebbene studi ne abbiano mostrato una buona attendibilità.

Parole chiave: ossido nitrico esalato, asma, asma grave, BPCO

Summary

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule acting as a key mediator in several fundamental physiologic processes of the human body. Since Gustafsson and colleagues showed the presence of NO in the exhaled breath of humans in 1991, NO gained a growing interest of researchers which consider this molecule as a suitable diagnostic biomarker in respiratory diseases and asthma. The American Thoracic Society (ATS) and European Respiratory Society (ERS) released recommendations that standardize the measurement of the fractional exhaled NO (FeNO), that is defined as a non-invasive procedure capable of characterize airway inflammatory status. In asthmatic patients FeNO concentrations and levels of other T2 inflammation biomarkers, such as peripheral and sputum eosinophilia, correlate and can be used to describe asthma phenotypes. Researchers have identified, both for adults and children with asthma, several FeNO cut-offs that could suggest to start a treatment with inhaled corticosteroids (ICS) and help to determine poor adherence to treatment or positive response to ICS. In addition, as a biomarker of T2 inflammation FeNO can predict the response of asthmatic patients to biologics. Moreover, FeNO ≥ 25 ppb in severe asthmatics is a criterion for dupilumab treatment, despite high dose ICS therapy.

The use of FeNO in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and non-asthmatic eosinophilic bronchitis is until under debate, although recent evidence shows FeNO reliability.

Key words: exhaled nitric oxide, asthma, severe asthma, COPD

Ricevuto il 18-6-2021
Accettato il 9-7-2021

Corrispondenza

Fabio L.M. Ricciardolo

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche,
Università di Torino
S.S.D Interstiziopatie e Malattie Rare del Polmone,
AOU, San Luigi, Orbassano (TO)
regione Gonzole 10, 10043 Torino
fabio.luigimassimo.ricciardolo@unito.it

Conflitto di interessi

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

Come citare questo articolo: Ricciardolo FLM, Stufano S, Carriero V, et al. Utilizzo della misura di ossido nitrico nell'aria espirata: un update. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2021;36:118-122. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-A069>

© 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>

Come funziona?

L'ossido nitrico (NO) è un importante mediatore biologico in diversi processi fisiologici e fisiopatologici ^{1,2}. Nel 1991 Gustafsson e collaboratori ³ hanno scoperto che l'NO è presente nell'esalato dell'uomo e due anni dopo Alving e colleghi ⁴ dimostrarono che l'NO aumenta negli asmatici.

Tecniche di misurazione dell'ossido nitrico esalato

La metodica della chemiluminescenza è il *gold standard* nell'analisi dell'NO esalato (eNO). La reazione tra l'NO nel campione, e l'ozono generato dallo strumento determina l'emissione di radiazioni elettromagnetiche aventi lunghezza d'onda compresa tra 600-3.000 μm e che, rilevate ed amplificate, forniscono un segnale proporzionale alla concentrazione di NO ⁵.

L'apparecchiatura per la chemiluminescenza necessita di una fonte esterna di NO per generare ozono, ed è altamente sensibile con un livello soglia di rilevazione di parti per miliardo (1:10⁹ppb) ed un tempo di risposta molto rapido (0,5-0,7s) ⁶.

Gli analizzatori di eNO attualmente in commercio sono NOA 280i (Sievers, GE Analytical Instruments), NIOX (Circassia), Logan model LR2149 (Logan Research) e CLD 88 (Eco Medics).

I sensori elettrochimici convertono la concentrazione di NO in segnale elettrico ⁵, in presenza di un sistema tampone ed un sensore catalitico. Una reazione chimica induce nel campione un cambiamento fisico quantificabile e direttamente proporzionale alla concentrazione di NO.

I dispositivi a sensori elettrochimici o infrarossi commercialmente disponibili sono: NIOX VERO (Circassia), NObreath (Bedfont Scientific), Medisoft (Hypair) e Vivatmo-PRO (Bosch).

Il NIOX VERO è portatile, utilizzabile sia negli adulti che nei bambini ⁷ con un sensore che deve essere sostituito dopo 100-300 misurazioni. I pazienti devono effettuare un'espiazione di 10 secondi ad una pressione che garantisca una portata di $50 \pm 5 \text{mls}^{-1}$. Un sensore elettrochimico valuta i 3 secondi finali dell'espiazione esprimendo il risultato in un range di 5-300ppb.

NObreath è un dispositivo che richiede 12 secondi di espiazione nell'adulto e 10 nei bambini ⁷.

Il dispositivo Medisoft è semi-portatile e permette misurazioni *off-line* ed *on-line*, in un *range* di 0-600 ppb. La misurazione "off-line" prevede l'analisi di un campione di gas precedentemente raccolto, mentre quella "on-line" avviene in tempo reale.

Il Vivatmo-PRO è un dispositivo a sensori infrarossi portatile che fornisce un rapido responso non richiedendo la conservazione del campione in una camera.

Un recente studio ha dimostrato una buona correlazione tra alcuni di questi dispositivi anche se le misurazioni assolute dell'eNO potrebbero differire in modo clinicamente rilevante ⁸.

Sono stati sviluppati sensori ottici costituiti da una fonte di luce laser che reagisce con il gas del campione, una cella di raccolta ed un sistema di rilevamento che registra segnali nella banda di assorbimento del medio infrarosso (5,1- 5,7 μm) ⁹.

Misurazione dell'ossido nitrico esalato

L'American Thoracic Society (ATS) e la European Respiratory Society (ERS) hanno concordato una procedura altamente standardizzata per la misurazione della concentrazione frazionale dell'eNO (FeNO) ¹⁰. Secondo tali linee guida, la misurazione del FeNO negli adulti avviene istantaneamente durante una manovra di respirazione. Il soggetto deve inspirare a capacità polmonare totale con aria depurata, per non contaminare il campione con livelli potenzialmente alti di NO nell'ambiente. Successivamente esegue un'espiazione di 10 secondi ad una pressione di 5-20 cmH_2O , che garantisce la chiusura del palato molle minimizzando il rischio di contaminazione con l'NO dei seni paranasali. Un'espiazione è ritenuta adeguata se viene raggiunto un livello di concentrazione di eNO stabile (*plateau*) ad un flusso di 50 ml/s. Le linee guida raccomandano un flusso espiratorio di 50 ml/s, basato sull'ipotesi che la regione di interesse per l'escrezione di NO siano le basse vie respiratorie. I valori di *plateau*, corrispondenti alla portata espiratoria, variano considerevolmente con la velocità di flusso a causa della diffusione dell'NO delle vie aeree e tempo di transito. Per cui basse velocità (< 10 ml/s) determinano livelli più alti.

Analisi estesa dell'ossido nitrico

La misurazione del FeNO ad un solo flusso espiratorio non consente l'identificazione dei siti di produzione di NO nell'apparato respiratorio. Pertanto, sono stati messi a punto dei modelli matematici, ampiamente revisionati ¹¹, per calcolare la produzione dell'NO polmonare.

La frazioni di NO prodotte nelle pareti delle vie aeree ($J_{\text{aw}}\text{NO}$) e nella regione alveolare ($C_{\text{A}}\text{NO}$) possono essere cal-

colate ad alti flussi. Inoltre, l'associazione di calcoli matematici con misurazioni di NO ad alti e bassi flussi aerei può fornire i valori della concentrazione del gas rilasciato dal sistema di conduzione aerea ($C_{aw}NO$) e della capacità di diffusione di NO ($D_{aw}NO$).

In tutti gli analizzatori di chemiluminescenza, la portata espiratoria può essere modificata da resistori, mentre, in generale, i sensori elettrochimici non sono adatti per l'analisi di molteplici flussi ad eccezione di Medisoft.

Interpretazione dei risultati della misura del FeNO in asma

Nella pratica clinica sono stati definiti valori di riferimento per il FeNO (Tab. I).

Negli adulti, è considerato normale un valore di FeNO < 25 ppb (< 20 ppb nei bambini), mentre valori tra 25-50 ppb (20-35 ppb nei bambini) vanno interpretati nel contesto clinico.

Secondo le linee guida GINA, FeNO \geq 20 ppb è considerato il *cut-off* caratteristico dell'infiammazione di Tipo 2 nell'asma grave e viene utilizzato, insieme agli eosinofili ematici (\geq 300 cell/ μ l) e dell'espettorato (\geq 3%), per valutare questo fenotipo d'asma.

I valori di riferimento possono essere utilizzati come guida generale, tenendo conto che possono subire variazioni significative nei pazienti. Il coefficiente di variazione dei soggetti sani è approssimativamente del 10% (4 ppb di variazione) mentre aumenta fino al 20% negli asmatici (variazione considerata significativa dalle linee guida ATS). Valori di FeNO > 50 ppb (> 35 ppb nei bambini) sono associati all'infiammazione eosinofila delle vie aeree, possono prevedere una risposta alla terapia antinfiammatoria e suggerire l'opportunità di trattamento con ICS. Invece, FeNO < 25 ppb (< 20 ppb nei bambini) è correlato con una minore infiammazione eosinofila e risposta ai corticosteroidi. Misure > 30 ppb sono state associate ad asma non controllato, mentre un valore compreso tra 16-25 ppb definisce la Minima Differenza Clinicamente Significativa (un incremento fino al 60% del valore basale).

Infine, durante un'esacerbazione, il FeNO può aumentare oltre al 50% e fino a 150 ppb in seguito ad esposizione ad un allergene o infezione acuta.

Tabella I. Fattori che influenzano la produzione di FeNO (a) e interpretazione clinica dei valori di FeNO (b).

a) INFLUENZA SUI VALORI DI FeNO		b) INTERPRETAZIONE DEI VALORI DI FeNO		
Fattori determinanti	Variazione risultante	Cut-off (ppb) bambini	Cut-off (ppb) adulti	Significato
Caratteristiche demografiche				
• Età	↑			
• Altezza	↑			
• Genere	Maschile ↑ Femminile ↓			
Caratteristiche biologiche				
• Infiammazione eosinofila	↑			
• Infiammazione neutrofila	↓			
Co-patologie				
• Rinite allergica	↑			
• Rinosinusite cronica con poliposi nasale	↑			
• Obesità	↓			
• Reflusso gastroesofageo	↓			
Terapia				
• Uso di ICS	↓			
• Dupilumab	↓			
Altri fattori				
• Tabagismo	↓			
• Atopia	↑			
• Infezioni virali	↑			
• Broncocostrizione acuta	↓			
• Esacerbazione asmatica	↑			
		< 20	< 25	Valore nella norma
Pazienti sani		20-35	26-50	Valore alto significativo per eosinofilia bronchiale
Asma		> 35	> 50	Predizione di buona risposta a trattamento con ICS
			> 30	Asma non controllato
Asma grave			\geq 20	Infiammazione di tipo 2
			\geq 25	Predizione di buona risposta al trattamento con dupilumab

Qual è lo stato dell'arte?

Principali applicazioni cliniche dell'eNO

Asma

Alti valori di FeNO, in pazienti con sintomi rilevanti, possono confermare la diagnosi di asma. Infatti le linee guida NICE raccomandano l'integrazione dell'algoritmo diagnostico dell'asma con il test di FeNO associato alla valutazione della funzione polmonare.

Nell'asma non trattato, il valore del FeNO può superare i 100 ppb¹². Anche pazienti non aderenti al trattamento tendono ad avere alti valori di FeNO e quindi come tutti gli altri asmatici che non rispondono alla terapia, devono essere sottoposti al cosiddetto "test di soppressione del FeNO".

Inoltre il FeNO, essendo biomarker dell'infiammazione T2, può predire la risposta al trattamento con farmaci biologici. In particolare FeNO \geq 25 ppb, unitamente a conte eosinofile \geq 150 cell/ μ L, rappresenta un criterio predittivo di efficacia terapeutica del dupilumab in asmatici gravi trattati con alte dosi di ICS.

Misura del FeNO in asma grave

L'asma grave è definito dal documento ATS/ERS sulla base del trattamento necessario per raggiungerne il controllo. Recenti studi hanno mostrato associazioni dell'asma grave con il grado di infiammazione eosinofila¹⁴ e con una maggiore espressione dell'enzima NO sintetasi inducibile (iNOs), responsabile della produzione dell'eNO.

L'utilità della misura dell'eNO nella gestione dell'asma grave è tuttora dibattuto, soprattutto alla luce dell'azione inibitoria degli ICS su iNOS. Tuttavia un recente studio ha riportato elevati livelli di FeNO nel 50% degli asmatici gravi steroide-dipendenti esaminati. A ciò si aggiunge l'osservazione che alte concentrazioni di FeNO ed eosinofili del sangue ed espettorato che caratterizzavano asmatici gravi "late-onset", prevalentemente non atopici, erano associate alla gravità dell'asma. Un'ulteriore ricerca ha evidenziato che, in asmatici gravi, elevati valori di FeNO correlavano con maggiore reattività delle vie aeree, aumentata eosinofilia nell'espettorato, atopia, iperventilazione, ridotta percezione dei sintomi, maggiore ostruzione del flusso aereo, più accentuato *air-trapping* e più alto numero di accessi al pronto soccorso¹⁵.

Tutte queste evidenze suggeriscono che il FeNO sia un biomarcatore attendibile per identificare pazienti con asma grave.

Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

Il valore clinico del FeNO nei pazienti con BPCO è tuttora dibattuto. Secondo una recente metanalisi, la BPCO induce un lieve incremento di NO, con livelli più alti negli ex fumatori rispetto ai fumatori¹³. Non è stata riscontrata alcuna associazione tra FeNO e riacutizzazioni di BPCO. Alcuni studi mostrano, almeno nel breve termine, una maggior probabilità di risposta ai corticosteroidi nei pazienti con BPCO con elevati valori di FeNO, anche in termini di FEV₁.

La sindrome da *overlap* asma-BPCO (ACO) comprende caratteristiche sia dell'asma che della BPCO e il documento GINA/GOLD sull'ACO raccomanda di utilizzare i valori di FeNO e degli eosinofili ematici per differenziarla dalla BPCO.

Bronchite eosinofila non asmatica (NAEB)

La bronchite eosinofila non asmatica (NAEB) è caratterizzata da tosse secca stizzosa cronica, espettorato eosinofilo e buona responsività ai glucocorticoidi. Alcuni report indicano livelli di FeNO in pazienti con NAEB significativamente più elevati rispetto alle altre cause di tosse cronica. Secondo una metanalisi il FeNO potrebbe non essere abbastanza preciso da prevedere la NAEB nei pazienti non asmatici con tosse cronica. Tuttavia lo studio ha evidenziato una buona attendibilità di valori compresi tra 30-40 ppb, suggerendo di non trascurare l'utilità clinica dell'eNO, nell'identificare asmatici con tosse cronica responsivi ai corticosteroidi.

Prospettive di utilizzo di futuro

Il FeNO è un marcatore di infiammazione T2 delle vie aeree di facile misurazione, il cui monitoraggio è raccomandabile sia negli adulti che nei bambini, per la gestione dell'asma. Non è da escludere l'utilizzo del FeNO, unitamente ad altri test diagnostici e altri biomarcatori, per l'identificazione di precisi fenotipi asmatici e per la conseguente elaborazione di una terapia mirata al singolo individuo. Alla luce dei dati riportati in letteratura, ciò non può essere escluso per altre patologie respiratorie.

Bigliografia

- ¹ Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-765. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2003>
- ² Maniscalco M, Bianco A, Mazzeola G, Motta A. Recent advances on nitric oxide in the upper airways. *Curr Med Chem* 2016;23:2736-2745. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160627115335>
- ³ Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:852-857. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91268-h](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91268-h)
- ⁴ Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993;6:1368-1370.
- ⁵ Maniscalco M, Vitale C, Vatrella A, et al. Fractional exhaled nitric oxide-measuring devices: technology update. *Med Devices (Auckl)* 2016;9:151-160. <https://doi.org/10.2147/MDER.S91201>
- ⁶ Maniscalco M, Lundberg JO. Hand-held nitric oxide sensor NIOX MINO(R) for the monitoring of respiratory disorders. *Expert Rev Respir Med* 2010;4:715-721. <https://doi.org/10.1586/ers.10.67>
- ⁷ Harnan SE, Tappenden P, Essat M, et al. Measurement of exhaled nitric oxide concentration in asthma: a systematic review and economic evaluation of NIOX MINO, NIOX VERO and NObreath. *Health Technol Assess* 2015;19:1-330. <https://doi.org/10.3310/hta19820>
- ⁸ Molino A, Fuschillo S, Mosella M, et al. Comparison of three different exhaled nitric oxide analyzers in chronic respiratory disorders. *J Breath Res* 2019;13:021002. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/ab0167>
- ⁹ Wang C, Sahay P. Breath analysis using laser spectroscopic techniques: breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits. *Sensors (Basel)* 2009;9:8230-8262. <https://doi.org/10.3390/s91008230>
- ¹⁰ American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the on-line and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-930. <https://doi.org/10.1164/rccm.200406-710ST>
- ¹¹ George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol (1985)* 2004;96:831-839. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00950.2003>
- ¹² Ricciardolo FL, Sorbello V, Bellezza Fontana R, et al. Exhaled nitric oxide in relation to asthma control: a real-life survey. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2016;44:197-205. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.012>
- ¹³ Lu Z, Huang W, Wang L, et al. Exhaled nitric oxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018;13:2695-2705. <https://doi.org/10.2147/COPD.S165780>
- ¹⁴ Carr TF, Zeki AA, Kraft M. Eosinophilic and noneosinophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:22-37. <https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2232PP>
- ¹⁵ Ricciardolo FLM, Silkoff PE. Perspectives on exhaled nitric oxide. *J Breath Res* 2017;11:047104. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa7f0e>