

Pedro Martins¹
Iolanda Caires²
José Rosado Pinto³
Pedro Lopes da Mata⁴
Simões Torres⁵
Joana Valente⁶
Carlos Borrego⁷
Nuno Neuparth⁸

Medição do óxido nítrico no ar exalado: Utilização na avaliação de crianças com história de sibilância

The clinical use of exhaled nitric oxide in wheezing children

Recebido para publicação/received for publication: 07.11.05
Aceite para publicação/accepted for publication: 08.01.04

Resumo

Encontram-se publicados múltiplos trabalhos sobre o papel das determinações do óxido nítrico no ar exalado (FE_{NO}) no âmbito do estudo da inflamação brônquica que nos permitem afirmar que se trata duma medição simples, não invasiva e de grande utilidade na avaliação do doente asmático.

Abstract

The body of published work on the role of exhaled nitric oxide (FE_{NO}) in the study of bronchial inflammation allows it to be classed as a simple, non-invasive measurement that is very useful in evaluating asthmatic patients.

¹ Assistente Convidado, Departamento Universitário de Fisiopatologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa (Centro de Estudos de Patologia Respiratória); Assistente Eventual, Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia / *Guest Consultant, Department of Physiopathology, Faculty of Medical Sciences, Universidade Nova de Lisboa (Centre for Respiratory Pathology Studies); Future Consultant, Allergy and Clinical Immunology Unit, Hospital de Dona Estefânia pmartinsalergo@gmail.com*

² Técnica de Cardiopneumologia, Departamento Universitário de Fisiopatologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa (Centro de Estudos de Patologia Respiratória) / *Cardiopulmonology Technician, Department of Physiopathology, Faculty of Medical Sciences, Universidade Nova de Lisboa (Centre for Respiratory Pathology Studies)*

³ Director de Serviço, Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia / *Allergy and Clinical Immunology Unit, Hospital de Dona Estefânia*

⁴ Especialista em Imunoalergologia, Instituto Clínico de Alergologia / *Allergy and Clinical Immunology Specialist, Allergy and Clinical Immunology Institute*

⁵ Director de Serviço, Serviço de Pneumologia, Hospital de São Teotónio / *Director, Pulmonology Unit, Hospital de São Teotónio*

⁶ Engenheira do Ambiente, Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro / *Environmental Engineer, Department of Environmental and Land Planning, Universidade de Aveiro*

⁷ Professor Catedrático, Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro / *Cathedric Professor, Department of Environmental and Land Planning, Universidade de Aveiro*

⁸ Professor Auxiliar, Departamento Universitário de Fisiopatologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa (Centro de Estudos de Patologia Respiratória); Especialista em Imunoalergologia, Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia / *Assistant Professor, Department of Physiopathology, Faculty of Medical Sciences, Universidade Nova de Lisboa (Centre for Respiratory Pathology Studies); Allergy and Clinical Immunology Specialist, Allergy and Clinical Immunology Unit, Hospital de Dona Estefânia*

Este estudo foi realizado no âmbito do projecto Saud'AR (A Saúde e o Ar que Respiramos), uma parceria entre o Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, e foi financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian. Os doentes foram avaliados no Serviço de Pneumologia do Hospital de São Teotónio (Director: Dr. Simões Torres) / *This study was part of the Saud'AR (Health is the Air that we Breathe) Project and was undertaken jointly with the Department of Environmental and Land Planning of the Universidade de Aveiro and the Faculty of Medical Sciences, Universidade Nova de Lisboa. It was funded by the Calouste Gulbenkian Foundation. Patients were evaluated by the Pulmonology Unit of the Hospital de São Teotónio (Director: Dr. Simões Torres)*

No decurso de um estudo prospetivo sobre o impacto da poluição do ar sobre a saúde da população na cidade de Viseu (Projecto Saud'AR), foram identificadas crianças com história clínica de sibilância, mediante a aplicação de questionários do *International Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISAAC). As crianças foram submetidas posteriormente a um questionário padronizado, testes cutâneos *prick* para aeroalergénios, espirometria com prova de broncodilatação e medição de FE_{NO}. A idade média era de 7,8±1,1 anos. Comparando os doentes com queixas de sibilância e/ou dispnéia nos 6 meses anteriores à avaliação (n=27) com os que não apresentaram estes sintomas, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para o ΔFEV1 (mediana: 4,5% vs 8%, p=0,0399) e para o FE_{NO} (mediana: 12 ppb vs 23 ppb, p=0,0195, respectivamente). Se olharmos para as crianças que recorreram a broncodilatador nos seis meses anteriores à avaliação (n=19) e as compararmos com as que não necessitaram, encontramos diferenças para o FE_{NO}: mediana de 27 ppb versus mediana de 11 ppb, respectivamente; p<0,0001. Ao compararmos as crianças que recorreram a uma consulta de urgência nos seis meses anteriores à avaliação (n=9) e as compararmos com as que não recorreram, encontramos também diferenças estatisticamente significativas para o FE_{NO}: mediana de 28 ppb versus mediana de 13 ppb, p=0.0029.

Constatou-se assim que a existência de sintomas se associou melhor com o FE_{NO} de que com a espirometria.

Rev Port Pneumol 2007; XIV (2): 195-218

Palavras-chave: Sibilância, asma, óxido nítrico, FE_{NO}.

During a prospective study into the effects of air pollution on the health of the population of Viseu (Saud'AR Project), children with a clinical history of wheezing were identified through using the *International Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISAAC) questionnaire. Children later filled in a new standardised questionnaire and underwent skin-prick-tests, spirometry and FE_{NO} measurement. Their mean age was 7.8±1.1 years. Comparing those who wheezed in the 6 months before evaluation (n=27) with those who didn't, statistical differences for ΔFEV1 (8% median versus 4.5%, p=0.0399) and for FE_{NO} (23 ppb median versus 12 ppb, p=0.0195, respectively) were observed. Concerning children who needed a bronchodilator in the six previous months (n=19) and those who didn't, there was also a statistically significant difference in FE_{NO}: 27 ppb median versus 11 ppb median, respectively; p<0.0001. When comparing children who needed an unscheduled medical appointment in the six months previous to the evaluation (n=9) and those who didn't, there was also significant differences for FE_{NO}: 28 ppb median versus 13 ppb median, p=0.0029. In conclusion, the existence of symptoms seems to be better related to FE_{NO} than spirometry.

Rev Port Pneumol 2007; XIV (2): 195-218

Key-words: Wheezing, asthma, nitric oxide, FE_{NO}.

Introdução

O óxido nítrico (NO) é um importante mensageiro celular endógeno que se encontra largamente distribuído pelo organismo. Origina-

Introduction

Nitric oxide (NO) is an important endogenous cellular messenger found widely distributed through the organism. Origina-

nalmente designado como EDRF (*Endothelial Derived Relaxant Factor*), foi apenas em 1987 que se concluiu que este factor, que actua a diversos níveis, nomeadamente no músculo liso, se tratava do NO¹. Pensa-se hoje que o NO seja importante na regulação do fluxo sanguíneo das vias aéreas e dos pulmões e que uma desregulação na sua produção poderá ter um papel na patogénese da asma². Em 1991, Gustafsson³ detectou NO no ar expirado (FE_{NO}), mas foi em 1993 que Alving⁴ constatou que o NO se encontrava aumentado em doentes asmáticos, facto confirmado posteriormente por Kharitonov⁵. Estes trabalhos foram seguidos pelos de outros autores, tendo o nosso grupo sido pioneiro na implementação desta técnica em Portugal^{6,7} e tendo feito parte da *task force* da *European Respiratory Society* (ERS) que padronizou esta medida pela primeira vez em 1997⁸.

Encontram-se actualmente publicados centenas de trabalhos sobre o papel desempenhado pelo FE_{NO} no âmbito do estudo da inflamação brônquica que nos permitem afirmar que a sua medição é simples, não invasiva e de grande utilidade na avaliação de um doente asmático.

Apesar da sua grande divulgação e cada vez maior utilização, nomeadamente desde o aparecimento dos analisadores portáteis, esta técnica de avaliação da inflamação das vias aéreas confronta-se com alguns problemas. Um ponto controverso na utilização do FE_{NO} na prática clínica prende-se com a atopia, dado que dentro dos não asmáticos os sensibilizados a aeroalergénios apresentam valores de FE_{NO} superiores aos dos não sensibilizados, nomeadamente se a alergia for aos ácaros do pó doméstico^{9,10}. Contudo, apesar da associação existente entre sensibilização a aeroalergénios e aumento do FE_{NO}, esta associação é mais forte em crianças sensibilizadas e com história de sibilância nos

nally known as EDRF (*Endothelial Derived Relaxant Factor*), only in 1987 was it concluded that this factor, which acts at several levels, particularly the smooth muscle, was in fact NO¹. Today it is believed that NO plays an important part in regulating blood flow of the airway and lungs and that any deregulation in its production can impact on the pathogenesis of asthma². In 1991 Gustafsson³ detected NO in exhaled air (FE_{NO}), and in 1993 Alving⁴ stated that asthmatics have increased NO; later confirmed by Kharitonov⁵. These studies were followed by others, with our group pioneers in implementing this technique in Portugal^{6,7} and joining the European Respiratory Society (ERS) Task Force which standardised this measurement for the first time in 1997⁸.

There are currently hundreds of published papers on the role FE_{NO} plays in the study of bronchial inflammation and these all affirm that measuring FE_{NO} is simple, non-invasive and of great use in evaluating patients with asthma.

While the use of FE_{NO} is widely known and its use increasing, particularly with the advent of portable devices, this tool for evaluating inflammation of the airway is not without its controversy. One sticking point in the use of FE_{NO} in clinical practice is that of atopia, as non-asthmatics sensitised to aeroallergens have higher FE_{NO} values than non-sensitised non-asthmatics, particularly if the allergy is to house-dust-mites^{9,10}. Despite this existing association between sensitisation to aeroallergens and raised FE_{NO}, this association is stronger in sensitised children and with a history of wheezing within the last 12 months¹¹. Asthmatic children sensitised to

Foi em 1993 que Alving constatou que o NO se encontrava aumentado em doentes asmáticos

Um ponto controverso na utilização do FE_{NO} na prática clínica prende-se com a atopia

últimos 12 meses¹¹. As crianças asmáticas sensibilizadas a dois ou mais aeroalergénios têm valores mais elevados de FE_{NO} comparativamente às monossensibilizadas¹².

Um outro problema da utilização do FE_{NO} é o desconhecermos com exactidão os valores esperados em indivíduos saudáveis, dada a existência de poucos estudos em grandes populações. Por outro lado, vários autores têm sugerido que os valores de FE_{NO} podem ser condicionados pela idade, altura, sexo, e índice de massa corporal do indivíduo^{13,14,15,16}.

Num dos maiores estudos efectuados em idade pediátrica, foram estudadas 405 crianças e adolescentes, obtendo-se para a idade dos 6-9 anos valores médios de 8 ppb¹³.

Relativamente a adultos, num estudo efectuado em 2200 indivíduos com idades compreendidas entre os 25-70 anos, seleccionados aleatoriamente, obtiveram-se para indivíduos não fumadores e ex-fumadores sem o diagnóstico médico de asma valores de mediana de 17 ppb e de 10,6 ppb para fumadores. Neste estudo, o sexo masculino apresentou valores ligeiramente superiores de FE_{NO}, comparativamente ao sexo feminino¹⁷. Num estudo recentemente publicado, foram estudados 1131 adultos saudáveis sem história de hábitos tabágicos, sendo proposta uma fórmula do FE_{NO} que tem em conta a idade e a altura, concluindo-se que os limites superiores do FE_{NO} poderão variar entre 24 ppb e 54 ppb¹⁸. Quando se efectuam medições de acordo com as recomendações da *American Thoracic Society* e da *European Respiratory Society*¹⁹, os resultados sugerem que adultos saudáveis terão valores da ordem dos 10-25 ppb e que as crianças apresentarão valores ligeiramente inferiores (5-20 ppb)²⁰.

Relativamente aos valores de FE_{NO} em doentes asmáticos, encontram-se vários valores médios

two or more aeroallergens have higher FE_{NO} values than mono-sensitised children¹².

A further problem found in using FE_{NO} is that the exact values to be expected of healthy individuals are not known, as there are few studies into large-scale populations. Additionally, several authors have suggested that FE_{NO} values can be affected by an individual's age, height, gender and body mass index^{13, 14, 15, 16}. One of the largest studies undertaken into paediatric age children had a universe of 405 children and adolescents and obtained mean values of 8 ppb for 6-9 year olds¹³.

In terms of adults, a study undertaken into 2200 individuals aged 25-70 years old selected at random obtained median values of 17 ppb for non-smokers and ex-smokers not diagnosed with asthma and median values of 10.6 ppb for smokers. Here males had slightly higher FE_{NO} values than females¹⁷. A recently published study into 1131 healthy adult never-smokers proposed a FE_{NO} formula that allowed for age and height and concluded that upper FE_{NO} limits could range from 24 ppb to 54 ppb¹⁸.

Results of measurements made following American Thoracic Society and European Respiratory Society¹⁹ recommendations suggest that healthy adults present values ranging around 10-25 ppb and children have slightly lower values (5-20 ppb)²⁰.

There are several published mean values of 50 ml/s for the expiratory flow rate in online measurements of asthmatics' FE_{NO} values. The large majority of studies were undertaken from samples of patients recruited via medical appointments, mea-

Os valores de FE_{NO} podem ser condicionados pela idade, altura, sexo, e índice de massa corporal do indivíduo

publicados para o débito expiratório de 50 ml/s em medições *online*. A grande maioria dos estudos tem sido efectuado a partir de amostras de doentes recrutados em consultas, pelo que podem ser enviesados pela inclusão de doentes de maior gravidade. Entre outros valores, podemos encontrar: 61,7±48,4 ppb em adultos²¹, 52±34 ppb numa população de adultos e crianças²², 24,9±22,3 ppb em crianças²¹ e 22,1±3,4 ppb também em crianças²³. Poucos foram os estudos que efectuaram medições *online*, recrutaram doentes na população geral e que cumpriram os requisitos do débito de 50 ml/s. Num dos estudos mais bem conduzidos, foram avaliadas crianças dos 8-10 anos, caracterizadas clinicamente através do questionário do estudo *International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC)*, tendo-se obtido valores de 24,4 ppb em crianças com asma alérgica e de 7,8 ppb em crianças com asma não alérgica²⁴. Apesar de ser consensual que o FE_{NO} se encontra aumentado em doentes asmáticos, tem sido difícil estabelecer, de uma forma unânime, um valor de *cutoff* para o diagnóstico de asma. É, no entanto, claro que valores de *cutoff* de FE_{NO} elevados apresentam uma elevada especificidade e uma baixa sensibilidade diagnósticas, passando-se o contrário com valores de *cutoff* de FE_{NO} baixos. Num estudo que envolveu 71 crianças, valores superiores a 17 ppb apresentaram uma sensibilidade e especificidade de 81% e 80%, respectivamente²⁵. Outro valor de *cutoff* sugerido foi de 9,7 ppb em crianças em idade pré-escolar num estudo que envolveu 96 crianças e onde se obteve uma sensibilidade de 86%, uma especificidade de 92% e um valor preditivo negativo de 95%²³. Smith estudou uma população composta por 47 adultos e crianças, sugerindo que o valor de 20 ppb teria uma sensibilidade de 88% e uma especificidade da ordem dos 80%²². Autores portugueses avalia-

ning these could be skewed by the inclusion of severely ill patients. Other values cite 61.7±48.4 ppb in adults²¹, 52±34 ppb in an adults/children population²², 24.9±22.3 ppb in children²¹ and 22.1±3.4 ppb also in children²³. Only a few studies have online measurements, recruit patients from the population at large and comply with the 50 ml/s flow rate requisites. In one of the better-conducted studies, 8-10 year old children were assessed, clinically characterised via the *International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC)* questionnaire, and values of 24.4 ppb were obtained for asthmatic children and 7.8 ppb for non-allergic asthma children²⁴.

While it is agreed that asthma patients have raised FE_{NO}, a unanimous cut-off value for the diagnosis of asthma has been difficult to establish. It is clear that high FE_{NO} cut-off values present a high diagnostic specificity and a low diagnostic sensitivity, but it is the opposite case with low cut-off FE_{NO} values. In a 71-children study, values over 17 ppb had 81% sensitivity and 80% specificity²⁵. Another cut-off value suggested was 9.7 ppb in a study into 96 pre-school age children that obtained 86% sensitivity, 92% specificity and 95% negative predictive value²³. Smith studied a population of 47 adults and children and suggested a value of 20 ppb would have 88% sensitivity and approx. 80% specificity²². Portuguese authors studied a population of 87 adults and concluded that a value of 20 ppb would present 74% sensitivity and 67% specificity²⁶. A recently published article had a cut-off value of 33 ppb, giving 83.4% sensitivity and 84.9% specificity²⁷.

Apesar de ser consensual que o FE_{NO} se encontra aumentado em doentes asmáticos, tem sido difícil estabelecer, de uma forma unânime, um valor de cutoff para o diagnóstico de asma

ram uma população de 87 adultos, concluindo que o valor de 20 ppb apresentaria uma sensibilidade de 74% e especificidade de 67%²⁶. Recentemente, foi publicado um outro artigo em que um valor de *cutoff* de 33 ppb teria uma sensibilidade e uma especificidade de 83,4% e 84,9% respectivamente²⁷.

A avaliação do doente asmático é complementada pelo estudo funcional respiratório, nomeadamente através da espirometria. Trata-se dum exame robusto, convenientemente validado, com valores de referência estabelecidos e com orientações sobre o modo de execução e interpretação já publicadas²⁸. Contudo, as avaliações efectuadas através da espirometria/prova de broncodilatação não são perfeitas, nomeadamente em crianças em idade escolar²⁹. De facto, o *score* de sintomas parece correlacionar-se melhor com o FE_{NO} de que com o FEV₁³⁰. As correlações do FE_{NO} com o FEV₁ basal ou ΔFEV₁ encontradas na literatura são díspares e, quando alcançadas, tendem a ser negativas para o FEV₁ e positivas para o ΔFEV₁^{31,32,33}. Estes exames parecem constituir duas formas complementares de olhar para a asma.

Na última revisão da *Global Initiative of Asthma* (GINA) foi proposta uma nova classificação que assenta no grau de controlo que tem em conta a existência de sintomas, a utilização de medicação de alívio, a existência de exacerbações e a função respiratória³⁴. A medição do FE_{NO} não foi recomendada nesta revisão, sugerindo que ainda é um exame complementar que carece de validação na sua utilização como método de diagnóstico de asma.

Material e métodos

Foi nosso objectivo determinar o interesse da medição do óxido nítrico no ar exalado (FE_{NO}) em crianças com história de sibilân-

The evaluation of the asthma patient is complemented by respiratory function study, particularly spirometry. Spirometry is a robust exam, appropriately validated, with established reference values and which has published guidelines on how to use it²⁸. That said, spirometry/bronchodilation challenge evaluations are not flawless, particularly in school-age children²⁹ and the sum of the symptoms seem to correlate better with the FE_{NO} than the FEV₁³⁰. The FE_{NO} correlations with basal FEV₁ or ΔFEV₁ found in the literature are dissimilar and when reached tend to be negative for FEV₁ and positive for ΔFEV₁^{31,32,33}. These exams seem to be two complementary ways to look at asthma.

The last revision of the Global Initiative of Asthma (GINA) proposed a new classification based on the degree of control, taking into account if there are symptoms, if relief medication is used, if there are attacks and also lung function³⁴. This revision did not recommend measuring FE_{NO}, suggesting that it is still a complementary exam whose use as a diagnostic tool for asthma diagnosis still needs validating.

Material and methods

Our aim was to determine the usefulness of measuring exhaled nitric oxide (FE_{NO}) in children with a history of wheezing, recruited after responding to a questionnaire on the prevalence of asthma and allergic disease.

Patient group

A study was launched to evaluate the impact of pollution on the health of a popu-

A avaliação do doente asmático é complementada pelo estudo funcional respiratório, nomeadamente através da espirometria

cia recrutadas na sequência da aplicação de um questionário de prevalência de asma e de doença alérgica.

Grupo de doentes

No decurso de um estudo que pretende avaliar o impacto da poluição sobre a saúde de uma população de risco na região de Viseu (Projecto Saud'AR), foram identificadas crianças com história clínica de sibilância mediante a aplicação de 805 questionários do estudo *International Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISAAC) em 4 escolas do 1.º ciclo da cidade de Viseu, em Dezembro de 2005. Foram devolvidos 80% dos questionários entregues, identificando-se 77 crianças com sibilância (prevalência de sibilância no último ano de 11,7% nas escolas estudadas). Os pais das crianças foram contactados telefonicamente no sentido de estas participarem num estudo prospetivo que incluiu avaliações médicas periódicas (duas vezes por ano) que englobaram: aplicação de questionário padronizado, realização de testes cutâneos *prick* para aeroalergénios, espirometria com prova de broncodilatação e medição de FE_{NO}. As 54 crianças que aceitaram participar foram reavaliadas em Junho de 2006, tendo sido suspensa a medicação de controlo da asma nas 3 semanas anteriores à avaliação.

Na data da avaliação, de acordo com o questionário padronizado, todas as crianças foram classificadas em 3 itens: 1) presença ou não de sibilância/dispneia nos 6 meses anteriores; 2) necessidade ou não de tratamento com broncodilatador nos 6 meses anteriores; 3) necessidade ou não de consulta médica não programada por dispneia nos 6 meses anteriores. Estes itens correspondem a critérios de gravidade crescente, pressupondo que, por exemplo, se uma criança recorreu a uma consulta médica não programada, terá

lacionada em risco na região de Viseu; the Saud'AR Project and as part of this, children with a clinical history of wheezing were identified through the 805 International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) questionnaires sent out to 4 primary schools in Viseu city in December 2005. 80% of these were returned and 77 children with a history of wheezing were identified. The schools in question had an 11.7% prevalence of wheezing over the last year. The children's parents were telephoned and their consent obtained to their children taking part in a prospective study which involved twice-yearly medical examinations, the use of a standardised questionnaire, skin-prick-tests for aeroallergens, spirometry with bronchodilation challenge and FE_{NO} measurement. The 54 children who agreed to take part were re-evaluated in June 2006; asthma control medication having been suspended in the 3 weeks prior to the evaluation.

The protocol dictated that the children were categorised at the evaluation date under one of three headings: 1) wheezing/dyspnoea over the prior 6 months, 2) recourse or not to bronchodilator over the prior 6 months, and, 3) the need or not for an unscheduled doctor's appointment over the prior 6 months. These headings reflect increasingly severe criteria, presupposing that, for instance, if a child needs an unscheduled doctor's appointment, he/she would have wheezing/dyspnoea and recourse to a bronchodilator. The children within each heading were compared.

The children were subdivided further into two groups, aeroallergen sensitised and non-

tido sibilância/dispneia e recorrido a broncodilatador. As crianças dentro de cada item foram comparadas.

Subdividiram-se ainda as crianças em dois grupos: sensibilizadas e não sensibilizadas a aeroalergénios. A presença de sintomas e resultados dos exames efectuados foi também comparada.

Testes cutâneos *prick*

Efectuaram-se testes cutâneos *prick* (Leti®) com os seguintes extractos alergénicos: controlo positivo (histamina 10mg/ml), controlo negativo (solução fenolada), *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, epitélio de cão, epitélio de gato, barata germânica, alternária, pólenes de gramíneas (mistura), oliveira, parietária, cipreste, bétula e carvalho. A introdução de extractos na pele foi efectuada mediante a utilização de lancetas Stallerpoint®. Foi considerado um resultado positivo uma pápula com eritema com diâmetro médio superior a 3mm.

Espirometria com prova de broncodilatação

Este exame foi efectuado de acordo com as actuais recomendações da *American Thoracic Society* e da *European Respiratory Society*²⁸. O espirómetro utilizado foi um Vitalograph® Compact (Buckingham, UK). Para a prova de broncodilatação, foram administradas 200µg de salbutamol.

Medição de FE_{NO}

O FE_{NO} foi medido após a espirometria recorrendo a um analisador portátil, o Niox® Mino (Aerocrine, Suécia), em que o débito expiratório é mantido a 50 mL/s. Foram seguidas as recomendações da *American Thoracic Society* e da *European Respiratory Society*¹⁹. Este analisador

sensitised. Symptoms and exam results were also compared.

Skin-prick-tests

Skin-prick-tests (Leti®) were carried out with the following aeroallergens: positive control (histamine 10mg/ml), negative control (phenol-saline solution), *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, dog dander, cat dander, cockroach, alternaria, grass mix, olive tree, pellitory plant, cypress, birch and oak trees. Extracts were introduced into the skin using Stallerpoint® blood lancets. A wheal with erythema with mean diameter over 3mm was considered a positive result.

Spirometry with bronchodilation challenge

This exam was carried out in line with current American Thoracic Society and European Respiratory Society²⁸ recommendations. The spirometer used was a Vitalograph® Compact (Buckingham, UK). 200µg of salbutamol were administered for the bronchodilation challenge.

FE_{NO} measurement

FE_{NO} measurement was read after the spirometry was performed, using a portable analyser, Niox® Mino (Aerocrine, Sweden), in which the expiratory flow rate is maintained at 50 mL/s. American Thoracic Society and European Respiratory Society¹⁹ recommendations were followed. This portable analyser has a different pre-calibration system and electrochemical sensor to the chemiluminescence-based stationary system devices. It can be used to measure FE_{NO} in both adults and children and has been com-

portátil possui um sistema de pré-calibração e um sensor electroquímico diferente do de quimioluminescência existente nos analisadores de bancada, podendo ser utilizado para medições de FE_{NO} em adultos e em crianças, tendo sido comparado com os analisadores convencionais^{35,36,37}. O nosso grupo contribuiu para a sua validação^{38,39,40}. As suas medições são reproduzíveis, comparáveis às medições obtidas com os analisadores de bancada. A inspiração profunda é feita a partir do interior do analisador através de um filtro e até à capacidade pulmonar total. O débito é mantido a 50ml/s, podendo ser controlado através do ecrã e da emissão de um sinal acústico.

O Niox[®] Mino é um analisador bastante atractivo que, para além da portabilidade (peso de aproximadamente 800g, dimensões de 24x13x10cm), apresenta como principais vantagens a sua simplicidade de utilização, não só para o doente mas também para o clínico, que se reflecte essencialmente no número de medições necessárias (uma manobra expiratória validada pelo aparelho é considerada suficiente) e na rapidez dos resultados. Como desvantagens, refira-se o curto tempo de vida do analisador (3 anos ou 1200 medições), o custo de cada uma das medições e a impossibilidade de obter uma curva de valor de óxido nítrico e pressão *versus* tempo. A impossibilidade de efectuar manobras expiratórias inferiores a 6 por segundo condiciona a utilização em idade pré-escolar.

Análise estatística

Para as comparações intergrupo relativas aos valores obtidos na espirometria e nas medições de FE_{NO} aplicou-se o teste não paramétrico para amostras independentes, de Mann-Whitney. Na comparação de dados nominais recorreu-se ao teste exacto de Fisher. O *software* utilizado foi o Medcalc[®] 8.2.1.0.

pared with conventional devices^{35, 36, 37}. Our group contributed to its validation^{38, 39, 40}. Its measurements are reproducible and comparable to the measurements obtained from stationary system analysers. A deep breath to total lung capacity is taken inside the analyser through a filter. A flow rate of 50ml/s is maintained, controlled via visual and auditory feedback.

The Niox[®] Mino analyser is an attractive choice. Portable, weighing approx. 800g, and measuring 24x13x10cm, the small number of measurements necessary (one machine-validated exhalation is enough) and the swiftness of the results make it both patient- and clinic-friendly. Disadvantages are the device's short life span of 3 years or 1200 measurements, the cost of each measurement and the impossibility of obtaining a nitric oxide value and pressure *versus* time curve. The expiratory readings take at least 6 seconds, which impacts on using this system in pre-school-age children.

Statistical analysis

Intergroup comparisons of the spirometry values and the FE_{NO} measurements were made using the Mann-Whitney non-parametric test for independent samples. The Fisher Exact test was used to compare nominal data. Medcalc[®] 8.2.1.0 software was used.

ROC (receiver operating characteristic) curves were drawn up for each clinical heading (if there was wheezing/dyspnoea, the need to use a bronchodilator, the need for an unscheduled doctor's appointment for dyspnoea in the prior 6 months). The AUC (area under the curve)

Para cada um dos itens clínicos referidos (presença ou não de sibilância/dispneia, necessidade ou não de tratamento broncodilatador, necessidade ou não de consulta médica não programada por dispneia nos 6 meses anteriores) foram construídas curvas de ROC (*receiver operating characteristic*) e medidas as áreas abaixo da curva (AUC: *area under the curve*) para os valores de FE_{NO} obtidos. Na curva de ROC, a sensibilidade (percentagem de verdadeiros positivos) é *plottada* contra a percentagem de resultados falsos positivos (1-especificidade). Quanto mais próxima se encontrar a linha do canto superior esquerdo do diagrama de ROC, maior será a soma da sensibilidade e de especificidade. O diagrama de ROC fornece um indicador da acuidade de um teste ao demonstrar as limitações deste em discriminar indivíduos com uma determinada característica (doentes) doutros que não a apresentem (saudáveis). A acuidade de um teste pode ser traduzida através do cálculo da AUC, obtendo-se um valor entre 0,5 (incapacidade de discriminar um grupo do outro) e 1 (discriminação perfeita).

O *cut-off* óptimo de FE_{NO} apresentado corresponde ao valor máximo obtido somando a especificidade com a sensibilidade, calculado pelo *software*. As fórmulas utilizadas para o cálculo da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram (VP: verdadeiros positivos; VN: verdadeiros negativos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos): $S=VP/(VP+FN)$, $E=VN/(VN+FP)$, $VPP=VP/(VP+FP)$, $VPN=VN/(VN+FN)$.

Resultados

Grupo de doentes

Das 54 crianças identificadas como tendo sibilância nos 12 meses anteriores à aplicação

was measured for the FE_{NO} values gleaned. In the ROC curve, sensitivity (percentage of true positives) is plotted against the percentage of false positive results (1-specificity). The nearer the line to the left upper corner of the ROC diagram, the greater the sum of sensitivity and specificity. The ROC diagram is an indicator of the accuracy of a test in showing the test's limitations in discriminating those with a specific characteristic from those without this characteristic (healthy individuals). The accuracy of a test can be shown by calculating the AUC; obtaining a value from 0.5 (incapacity to discriminate one group from another) to 1 (perfect discrimination).

The optimum cut-off for FE_{NO} shown is that of the maximum value, obtained by adding specificity and sensitivity, as calculated by the software. The formulas used to calculate sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were (TP: true positives; TN: true negatives; FP: false positives; FN: false negatives): $S=TP/(TP+FN)$, $E=TN/(TN+FP)$, $PPV=TP/(TP+FP)$, $NPV=TN/(TN+FN)$.

Results

Patient group

54 children were identified as having wheezing in the 12 months prior to responding to the ISAAC study questionnaire; 31 male, 23 female, mean age 7.8 ± 1.1 years old. Twenty-one were sensitised to at least one aeroallergen; 12 had positive skin-prick tests for grass and/or olive tree pollen and 19 for house-dust mites. In June 2006, 26

do questionário do estudo ISAAC, 31 eram do sexo masculino e 23 do feminino, apresentando uma idade média de $7,8 \pm 1,1$ anos. Vinte e uma encontravam-se sensibilizadas a pelo menos um aeroalergénio, sendo que 12 apresentaram positividade nos testes cutâneos para pólenes de gramíneas e/ou oliveira e 19 para os ácaros do pó doméstico. Em Junho de 2006, 26 crianças referiam ter tido pelo menos um episódio de sibilância e/ou dificuldade respiratória nos seis meses anteriores. Dezanove referiam ter necessitado de recorrer à inalação de broncodilatador e nove de se deslocar a um serviço de urgência neste período de tempo.

Espirometria e FE_{NO}

A taxa de sucesso foi de 100% para o FE_{NO} e espirometria. A prova de broncodilatação não reuniu critérios num doente. O valor médio do FEV_1 (em percentagem do valor teórico), o ΔFEV_1 (em percentagem de variação em relação ao valor basal), a concentração de óxido nítrico no ar exalado (FE_{NO}) em partes por bilião (ppb) foram respectivamente: $100 \pm 14\%$, $8,1 \pm 7,3\%$ e $20,8 \pm 14,7$ ppb. Quatro crianças apresentaram um valor de FEV_1 inferior a 80% do teórico, 14, um $\Delta FEV_1 \geq 12\%$ e 27 um $FE_{NO} > 15$ ppb.

A correlação entre FE_{NO} e FEV_1 , FEV_1/FVC e ΔFEV_1 foi baixa e não significativa estatisticamente (rho de $-0,189$, $-12,8$ e $0,038$, respectivamente).

Os resultados destes exames são apresentados no Quadro I. Se tivermos em conta as crianças que referiram ter tido pelo menos um episódio de sibilância e/ou dificuldade respiratória nos seis meses anteriores à avaliação e as compararmos com as que não tiveram estas queixas em igual período, en-

children had had at least one episode of wheezing and/or respiratory difficulty, nineteen had needed to use a bronchodilator and nine had needed to go to the Emergency Room in the prior six months.

Spirometry and FE_{NO}

FE_{NO} and spirometry had a 100% success rate while the bronchodilation challenge was unsuccessful in one patient. The mean FEV_1 value (a percentage of the theoretical value) was $100 \pm 14\%$, the ΔFEV_1 (a variation percentage in relation to the base value) was $8.1 \pm 7.3\%$ and the concentration of nitric oxide in exhaled air (FE_{NO}) in parts per billion (ppb) was 20.8 ± 14.7 ppb. Four children had a FEV_1 below 80% of the theoretical value, 14 patients had a $\Delta FEV_1 \geq 12\%$ and 27 patients had $FE_{NO} > 15$ ppb.

The correlation between FE_{NO} and FEV_1 , FEV_1/FVC and ΔFEV_1 was weak and not statistically significant (rho -0.189 , -12.8 and 0.038 respectively).

Table I shows the results of these exams. Comparing the children who had at least one wheezing and/or respiratory difficulty episode in the six months prior to the evaluation with those who were complaint-free during the same period, we find statistically significant differences for the ΔFEV_1 (8% median [p25-75%: 3.25-16.5%] versus 4.5% median [p25-75%: 3-7%] respectively; $p=0.0399$). We also find statistically significant differences for the FE_{NO} (23 ppb median [p25-75%: 12-31.75 ppb] versus 12 ppb median [p25-75%: 9-21.25 ppb] respectively; $p=0.0195$). We underline, however, that only 8 of the 26 children with complaints (30%) had a $\Delta FEV_1 \geq 12\%$

Quadro I – Distribuição dos valores do FEV₁, ΔFEV₁ e FE_{NO} de acordo com resultados dos testes cutâneos, presença ou não de sibilância/dispneia, necessidade ou não de tratamento com broncodilatador, necessidade ou não de consulta médica não programada por dispneia nos 6 meses anteriores

	n	FEV ₁ % [IQ]	ΔFEV ₁ % [IQ]	FE _{NO} ppb [IQ]	TC+/TC-
Sibilância/dispneia					
Sim	26	98 [85-109]	8 [3,25-16,5]*	23 [12-31,75]*	15/6
Não	28	100 [96-112]	4,5 [3-7]	12 [9-21,25]	6/27
Recurso a BD					
Sim	19	100 [84,25-108,75]	8 [2,25-14]	27 [19,75-34,25]§	11/8
Não	35	99 [93,75-111,75]	6 [3-10]	11 [9-18,75]	10/25
Recurso a SU					
Sim	9	100 [78,5-109,25]	8 [4,25-18,5]	28 [25,25-37,75]†	5/4
Não	45	99 [91,75-111,25]	5,5 [3-10]	13 [9-23]	16/29
Testes cutâneos					
Positivos	21	98 [82-106,75]	6 [1,5-16,5]	28 [12,25-32,75]§	---
Negativos	33	100 [94-111]	6 [4-9]	10 [8,5-12,25]	---

[IQ]: Intervalo interquartil; n: Número de crianças; BD: broncodilatador; SU: Consulta médica não programada; TC+/TC-: Número de crianças com testes cutâneos prick positivos/negativos

*: p<0.05; †: p<0.005; §: p<0.0001

Table I – FEV₁, ΔFEV₁ and FE_{NO} distribution in line with the skin-prick-test results, wheezing/dyspnoea or not, need for bronchodilator treatment or not, need for an unscheduled medical appointment for dyspnoea within the prior 6 months or not

	n	FEV ₁ % [IQ]	ΔFEV ₁ % [IQ]	FE _{NO} ppb [IQ]	SPT+/SPT-
Wheezing/dyspnoea					
Yes	26	98 [85-109]	8 [3.25-16.5]*	23 [12-31.75]*	15/6
No	28	100 [96-112]	4.5 [3-7]	12 [9-21.25]	6/27
Need for BD					
Yes	19	100 [84.25-108.75]	8 [2.25-14]	27 [19.75-34.25]§	11/8
No	35	99 [93.75-111.75]	6 [3-10]	11 [9-18.75]	10/25
Need for US					
Yes	9	100 [78.5-109.25]	8 [4.25-18.5]	28 [25.25-37.75]†	5/4
No	45	99 [91.75-111.25]	5.5 [3-10]	13 [9-23]	16/29
Skin-prick-tests					
Positive	21	98 [82-106.75]	6 [1.5-16.5]	28 [12.25-32.75]§	---
Negative	33	100 [94-111]	6 [4-9]	10 [8.5-12.25]	---

[IQ]: Interquartile interval; n: Number of children; BD: bronchodilator; US: Unscheduled medical appointment; SPT+/SPT-: Number of children with positive/negative skin-prick-tests

*: p<0.05; †: p<0.005; §: p<0.0001

contramos diferenças estatisticamente significativas para o ΔFEV_1 (mediana: 8% [p25-75%: 3.25-16.5%] *versus* mediana: 4,5% [p25-75%: 3-7%], respectivamente; $p=0,0399$) e para o FE_{NO} (mediana: 23 ppb [p25-75%: 12-31,75 ppb] *versus* mediana: 12 ppb [p25-75%: 9-21,25 ppb], respectivamente; $p=0,0195$). Contudo, chama-se a atenção para que somente 8 das 26 crianças com queixas (30%) apresentaram um $\Delta FEV_1 \geq 12\%$ e que 6 das 28 assintomáticas (21,4%) apresentaram esta variação.

Se olharmos para as crianças que referiram ter recorrido a broncodilatador nos seis meses anteriores à avaliação e as compararmos com as que não necessitaram de utilizar este tipo de medicação, encontramos diferenças estatisticamente significativas para o FE_{NO} : mediana de 27 ppb [p25-75%: 19,75-34,25 ppb] *versus* mediana de 11 ppb [p25-75%: 9-18,75 ppb], respectivamente; $p<0,0001$.

Ao compararmos as crianças que recorreram a uma consulta médica de urgência nos seis meses anteriores à avaliação e as compararmos com as que não necessitaram deste tipo de consulta, encontramos diferenças estatisticamente significativas somente para o FE_{NO} mediana de 28 ppb [p25-75%: 25,25-37,75 ppb] *versus* mediana de 13 ppb [p25-75%: 9-23 ppb], respectivamente; $p=0,0029$.

Tal como referido nos Métodos, calcularam-se os melhores valores discriminativos nesta população para cada um dos itens clínicos referidos (presença ou não de sibilância/dispneia, necessidade ou não de tratamento broncodilatador, necessidade ou não de consulta médica não programada por dispneia nos 6 meses anteriores), sendo apresentados no Quadro II. Valores inferiores a estas medições associaram-se a um aumento da sensibilidade e a um decréscimo da especificidade.

and that 6 of the 28 asymptomatic children (21.4%) showed this variation.

Comparing the children who needed to use a bronchodilator in the six months prior to the evaluation with those who had no need of this medication, we find statistically significant differences for the FE_{NO} : 27 ppb median [p25-75%: 19.75-34.25 ppb] *versus* 11 ppb median [p25-75%: 9-18.75 ppb] respectively; $p<0.0001$.

Comparing the children who needed to go to the Emergency Room in the six months prior to the evaluation with those who had no need of this service, we only find statistically significant differences for the FE_{NO} : 28 ppb median [p25-75%: 25.25-37.75 ppb] *versus* 13 ppb median [p25-75%: 9-23 ppb] respectively; $p=0.0029$.

As we stated in the Methods section, we calculated the best discriminative values in this population for each clinical heading (if there is wheezing/dyspnoea or not, the need for a bronchodilator or not, the need for unscheduled medical appointments for dyspnoea in the prior 6 months), and these are shown in Table II. Values below these measures are associated to an increased sensitivity and a decreased specificity.

The FE_{NO} value with the best sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value in this population was 17 ppb. Higher values were associated to the need for a bronchodilator in the six months prior to the evaluation (sensitivity 84.2%, specificity 73.5%, positive predictive value 63.1%, negative predictive value 89.6% and area under the ROC curve 0.85). The ROC curve for the need for bronchodilator treatment is given in Fig.1.

Quadro II – Melhores valores de *cut-off* para cada uma das características estudadas: presença ou não de sibilância/dispneia, necessidade ou não de tratamento com broncodilatador, necessidade ou não de consulta médica não programada por dispneia nos 6 meses anteriores; sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), *area under the ROC curve* (AUC)

Existência nos 6 meses anteriores	Cut-off FE _{NO}	S	E	VPP	VPN	AUC
Sibilância ou dispneia	23 ppb	50%	88,5%	80%	65,7%	0,695§
Tratamento com BD	17 ppb	84,2%	73,5%	63,1%	89,6%	0,85†
Consulta não programada	22 ppb	88,9%	72,1%	39,5%	96,9%	0,814*

BD: broncodilatador; *: p=0,0006; †: p=0,0076; §: p<0,0001

Table II – Best cut-off values for each parameter studied: wheezing/dyspnoea or not, bronchodilator treatment need or not, need for an unscheduled medical appointment for dyspnoea within the prior 6 months or not; sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), area under the ROC curve (AUC)

Within the prior six months	FE _{NO} cut-off	S	E	PPV	NPV	AUC
Wheezing or dyspnoea	23 ppb	50%	88.5%	80%	65.7%	0.695§
BD treatment	17 ppb	84.2%	73.5%	63.1%	89.6%	0.85†
Unscheduled medical appointment	22 ppb	88.9%	72.1%	39.5%	96.9%	0.814*

BD: bronchodilator; *: p=0.0006; †: p=0.0076; §: p<0.0001

Nesta população, o valor de FE_{NO}, que apresentou no seu conjunto a melhor sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, foi o de 17 ppb, associando-se valores superiores a necessidade de broncodilatador nos seis meses anteriores à avaliação (sensibilidade de 84,2%, especificidade de 73,5%, valor preditivo positivo de 63,1%, valor preditivo negativo de 89,6% e *area under the ROC curve* de 0,85). A curva de ROC relativa à necessidade de tratamento com broncodilatador é apresentada na Fig. 1.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre doentes sensibilizados e não sensibilizados a aeroalérgenos apenas para o FE_{NO}: mediana de 30 ppb [p25-75%: 24,5-42,25ppb] *versus* mediana: 11 ppb [p25-75%: 9-15,5 ppb],

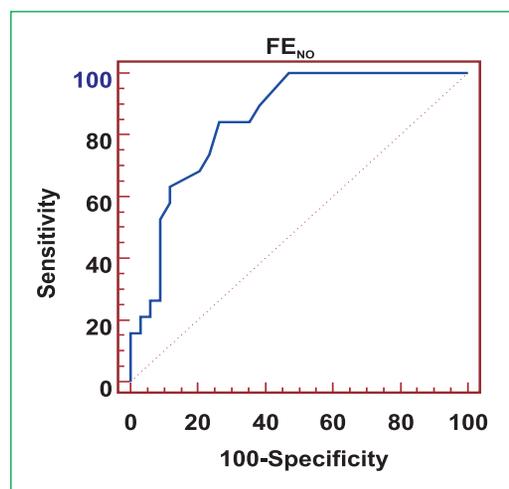


Fig. 1 – ROC (Receiver operating characteristic) curve showing the need for bronchodilator treatment. In the ROC curve, for each FE_{NO} measurement obtained via the Niox® Mino, sensitivity (percentage of true positives) is plotted against the percentage of false positive results (1-specificity): AUC=0.85, CI 95%: 0.725-0.93, p<0.0001; the dotted line equals an AUC of 0.5

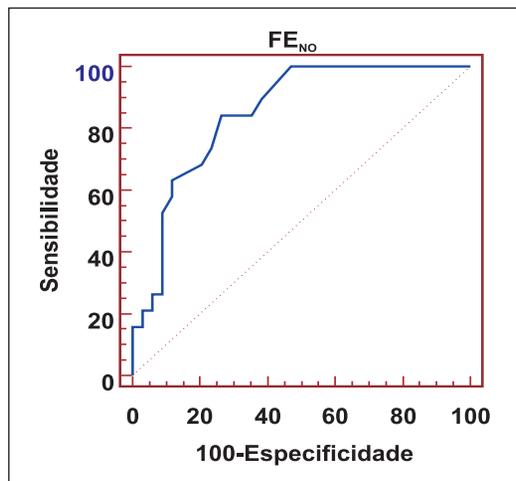


Fig. 1 – Curva ROC (*Receiver operating characteristic*) para a necessidade de recurso a tratamento broncodilatador. Na curva de ROC, para cada uma das medições do FE_{NO} obtidas através do Niox® Mino, a sensibilidade (percentagem de verdadeiros positivos) é plotada contra a percentagem de resultados falsos positivos (1-especificidade): AUC=0,85, IC 95%: 0,725-0,93, $p<0,0001$; a linha a tracejado corresponde a AUC=0,5

respectivamente; $p<0,0001$. Quinze dos 21 doentes sensibilizados a aeroalergénios (71%) apresentaram queixas de sibilância e/ou dificuldade respiratória nos seis meses anteriores à avaliação, contra 11 dos 33 doentes não sensibilizados (33%). Esta diferença é estatisticamente significativa ($p=0,006$). Os valores de FE_{NO} das crianças sensibilizadas a aeroalergénios com queixas respiratórias no período de tempo referido são superiores aos dos doentes não sensibilizados e que referiram igualmente queixas: mediana de 28 ppb [p25-75%: 12,25-32,75 ppb] *versus* mediana: 10 ppb [p25-75%: 8,5-12,25 ppb]; $p=0,0026$, excluindo os *outliers* (Fig. 2).

We found statistically significant differences between patients sensitised and non-sensitised to aeroallergens, particularly for the FE_{NO} : 30 ppb median [p25-75%: 24.5-42.25ppb] *versus* 11 ppb median [p25-75%: 9-15.5 ppb] respectively; $p<0.0001$. Fifteen of the 21 patients sensitised to aeroallergens (71%) had had wheezing and/or respiratory difficulty in the six months prior to the evaluation, as opposed to 11 of the 33 non-sensitised patients (33%). This difference is statistically significant ($p=0.006$). The FE_{NO} value in the children sensitised to aeroallergens with respiratory complaints in the time period in question is higher than those of non-sensitised patients who also had complaints: 28 ppb median [p25-75%: 12.25-32.75 ppb] *versus* 10 ppb median [p25-75%: 8.5-12.25 ppb]; $p=0.0026$, excluding the outliers (fig. 2).

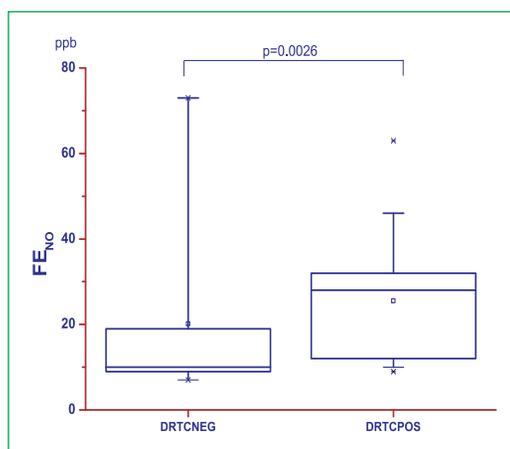


Fig. 2 – Comparação das FE_{NO} medições em crianças sensibilizadas a aeroalergénios com queixas de sibilância e/ou dificuldade respiratória nos seis meses anteriores à avaliação, com aquelas de crianças não sensibilizadas com queixas: 28ppb mediana [p25-75%: 12.25-32.75ppb] *versus*: 10 ppb mediana [p25-75%: 8.5-12.25 ppb]; $p=0.0026$, excluindo *outliers*

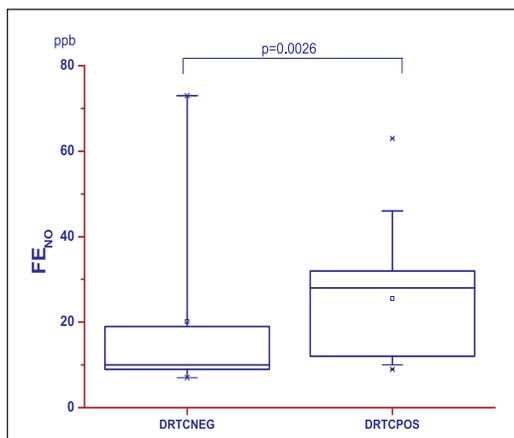


Fig. 2 – Comparação das medições de FE_{NO} das crianças sensibilizadas a aeroalergénios com queixas de sibilância e/ou dificuldade respiratória nos 6 meses anteriores à avaliação com as das crianças não sensibilizadas e que referiram igualmente queixas: mediana de 28ppb [p25-75%: 12,25-32,75ppb] versus mediana: 10 ppb [p25-75%: 8,5-12,25 ppb]; $p=0,0026$, excluindo os outliers

Discussão

Neste trabalho procurámos seleccionar um grupo de crianças com história de sibilância nos últimos 12 meses, queixa que constitui uma das definições epidemiológicas de asma activa em estudos de prevalência em crianças. Para a identificação desta queixa utilizámos um questionário convenientemente validado, aplicado numa população escolar de 805 crianças. Seis meses após a aplicação deste, 26 das 54 crianças incluídas referiam ter tido pelo menos um episódio de sibilância e/ou dificuldade respiratória, 19 referiam ter necessitado de recorrer a broncodilatador e nove de se deslocar a um serviço de urgência. Nos exames efectuados, quatro crianças apresentaram obstrução brônquica na espirometria e 14 uma melhoria significativa com o broncodilatador, sugerindo existência de uma broncomotricidade característica dos asmáticos. Vinte e sete crianças tiveram um valor de FE_{NO} superior a 15 ppb. As correlações entre a espirometria/prova de broncodilatação e o FE_{NO} fo-

Discussion

In our work we deliberately selected a group of children with a history of wheezing over the last 12 months, wheezing being a complaint which is one of the epidemiological definitions of active asthma in children. We used a duly validated questionnaire to identify this complaint, applying it to a school population of 805 children. Six months after applying the questionnaire, 26 of the 54 children had had at least one wheezing and/or respiratory difficulty episode, 19 had needed to use a bronchodilator and nine had to use the Emergency Services. Exams showed four children had bronchial obstruction on the spirometer and 14 significant improvement with the bronchodilator, suggesting the presence of the bronchomotricity characteristic of asthmatics. Twenty-seven children had a FE_{NO} value over 15 ppb. There were weak correlations between the spirometry/bronchodilation test and the FE_{NO} . The association of symptoms, recourse to relief medication and need for unscheduled doctors appointments were better associated with the FE_{NO} . FE_{NO} is also associated with aeroallergen sensitisation; sensitised symptomatic children have higher values than non-sensitised symptomatic children. This has also been observed by other authors, and it calls attention to the limited role the FE_{NO} plays in the evaluation of non-allergic asthma²⁴.

We feel our sample reflects the reality faced by the majority of wheezing children in this age group more accurately than a sample coming from patients referred to a specialist medical appointment. The latter would have a greater number of patients with severe symptoms and more marked inflammation of the airway. Our aim was

ram baixas. A associação de sintomas, recurso a medicação de alívio e recurso a consulta médica não programada associou-se melhor com o FE_{NO} . O FE_{NO} associou-se também com sensibilização a aeroalergénios, tendo as crianças sintomáticas sensibilizadas valores mais elevados do que as igualmente sintomáticas mas sem qualquer sensibilização. Esta observação coincide com a de outros autores, chamando a atenção para o papel limitado que o FE_{NO} tem na avaliação da asma não alérgica²⁴.

Esta amostra representará, no nosso entender, mais estreitamente a realidade da generalidade das crianças com sibilância desta faixa etária do que uma amostra proveniente de uma consulta externa de referência, que seria composta por um maior número de doentes com sintomas graves e inflamação das vias aéreas mais marcada. Era nosso objectivo procurar saber se numa amostra com estas características as crianças com queixas recentes de sibilância tinham valores de FE_{NO} superiores comparativamente àquelas que não apresentavam esta sintomatologia há mais de 6 meses, constatando-se que tal ocorria. De facto, as crianças assintomáticas nos 6 meses anteriores apresentaram um valor de mediana do FE_{NO} de 12 ppb, que se encontra dentro do limite da normalidade apontado para esta faixa etária¹³. Demonstrou-se igualmente que as crianças que nesse período de tempo referiram sintomas recorreram a medicação broncodilatadora ou a consulta não programada apresentaram valores de FE_{NO} superiores, comparativamente às crianças que não tiveram essa necessidade. Estas constatações sugerem que as crianças com valores mais elevados de FE_{NO} terão uma inflamação eosinofílica das vias aéreas na origem da recorrência das suas queixas.

Assumindo um grau crescente de gravidade das queixas: existência de dificuldade respiratória,

to investigate if in a sample with these characteristics, children with recent wheezing complaints had higher FE_{NO} values than those asymptomatic for over 6 months. This was in fact the case. Children asymptomatic over the preceding 6 months had a 12 ppb median FE_{NO} ; within the normal limits for this age group¹³. Further, children who had experienced symptoms or needed a bronchodilator or unscheduled doctor's appointments within this timeframe had higher FE_{NO} values than the children who had not needed these. This suggests that in children with higher FE_{NO} values, eosinophilic inflammation of the airway will be the cause of these recurrent complaints.

The fact that each increasingly more severe complaint – respiratory difficulty, need for bronchodilators and the recourse to Emergency Rooms – is accompanied by progressively higher FE_{NO} values suggests a link between the severity of the clinical picture and the FE_{NO} scores: 23 ppb median [p25-75%: 12-31.75 ppb], 27 ppb median [p25- 75%: 19.75-34.25 ppb] and 28 ppb median [p25-75%: 25.25-37.75 ppb] in turn.

We aimed to determine the best FE_{NO} cut-off, despite the small sample size. In children with wheezing episodes in the 12 months prior to filling in the ISAAC questionnaire, those with a stronger need for bronchodilators and unscheduled doctors' appointments in the six months prior had a FE_{NO} over 17 and 22 ppb in turn, values with a good sensitivity and specificity. The best cut-off value found for wheezing/dyspnoea had a low sensitivity, leading us to conclude that assessing the FE_{NO} is a useful diagnostic tool and one

necessidade de terapêutica broncodilatadora e recurso ao serviço de urgência, a observação de que encontramos valores de FE_{NO} progressivamente superiores para cada uma destas situações, é algo que sugere uma relação entre a gravidade da situação clínica e as medições de FE_{NO} : mediana de 23 ppb [p25-75%: 12-31,75 ppb], mediana de 27 ppb [p25-75%: 19,75-34,25 ppb] e mediana de 28 ppb [p25-75%: 25,25-37,75 ppb] respectivamente.

Apesar da pequena amostra de crianças, procurámos determinar qual o melhor *cutoff* de FE_{NO} . Constatámos que, em crianças com antecedentes de sibilância nos 12 meses anteriores à aplicação do questionário do ISAAC, as que mais recorreram a tratamento broncodilatador e a consulta médica não programada nos seis meses subsequentes tiveram um FE_{NO} superior a 17 e 22 ppb, respectivamente, valores que apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade. De referir que o melhor valor de *cutoff* encontrado para as queixas de sibilância/dispneia apresentou uma baixa sensibilidade. Por este motivo, parece-nos que a medição do FE_{NO} , a ser útil no diagnóstico, será essencialmente nas crianças menos controladas.

Salienta-se que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre crianças assintomáticas nos 6 meses anteriores e crianças com sibilância ou dificuldade respiratória, mas somente para o ΔFEV_1 . Contudo, apenas 8 (30%) das crianças sintomáticas apresentaram valores de $\Delta FEV_1 \geq 12\%$. O facto de não se terem observado diferenças estatisticamente significativas para a espirometria entre crianças que necessitaram de recurso de tratamento broncodilatador ou não e as que necessitaram de se deslocar ao serviço de urgência ou não, deve-se em parte à dimensão da amostra.

essential for children with less well controlled disease.

We underline that there were statistically significant differences between children with no symptoms in the 6 months prior and children with wheezing or respiratory difficulty, but only in the ΔFEV_1 . Only 8 (30%) of the children with symptoms had ΔFEV_1 values $\geq 12\%$. The lack of statistically significant spirometry differences between children who had needed a bronchodilator or not and those who had needed to go the Emergency Services or not is partly due to the sample size.

Lung function study in asthma permits us to evaluate the severity, reversibility and variability of the limitation to the airflow. Asthma is an obstructive disease and spirometry is the method of choice for measuring the limitation of the airflow to the airway and studying its reversibility. An increase to the FEV_1 of $\geq 12\%$ and 200ml after bronchodilator use indicates reversibility of the airway, consistent with a diagnosis of asthma.

In terms of inflammation of the airway, the bronchial obstruction is variable over time, meaning many asthmatics will not present spirometry abnormalities and so a battery of tests is necessary until signs of obstruction or reversibility are found³⁴. In terms of studying variability, there are arguments in favour of outpatient peak expiratory flow (PEF) measurement. Rationale for its use centres on the more lung function measurements there are, the greater the possibility of these representing the pattern of the disease, given the variability of the airway. Asthmatics have a greater daytime PEF variation than healthy individuals^{41, 42}, with this characteristic connected to bronchial hyperresponsiveness⁴³. Monitoring PEF can

O estudo da função pulmonar na asma permite uma avaliação da gravidade, reversibilidade e variabilidade da limitação do débito aéreo. Tratando-se de uma doença obstrutiva, a espirometria constitui o método de eleição para medir a limitação do débito das vias aéreas e estudar a reversibilidade. Um aumento do FEV1 $\geq 12\%$ e de 200ml após administração de broncodilatador indica reversibilidade das vias aéreas, observação que é consistente com o diagnóstico de asma. Contudo, em virtude da inflamação das vias aéreas, a obstrução brônquica é variável ao longo do tempo, pelo que muitos dos doentes asmáticos não apresentarão qualquer alteração espirométrica, podendo ser necessários vários testes até se encontrar algum sinal de obstrução ou de reversibilidade³⁴. Para o estudo da variabilidade, tem sido defendida a medição ambulatória do *peak expiratory flow* (PEF). O racional da sua utilização assenta no facto de, quanto maior o número de medições da função pulmonar, maior a probabilidade de que estas traduzam o padrão da doença, dada a variabilidade das vias aéreas. Os asmáticos apresentam uma variação diurna do PEF maior do que os indivíduos saudáveis^{41,42}, relacionando-se esta característica com a hiperreatividade brônquica⁴³. A monitorização do PEF poderá constituir assim uma ferramenta útil no diagnóstico e na monitorização da asma. Contudo, parece existir um grande intervalo de valores de variabilidade diurna do PEF entre doentes de gravidade idêntica e uma sobreposição entre asmáticos de gravidade diferente^{44,45}. Tal deve-se ao facto de o PEF avaliar essencialmente as vias aéreas de grande calibre. De referir que na criança poderá constituir uma expectativa irrealista (para além da fraca adesão enfrentamos a possibilidade de adulteração de resultados, se o dispositivo for manual).

be a useful tool in diagnosing and monitoring asthma. There seems, however, a large difference in the variable daytime PEF values of patients with identical severity and similarity among asthmatics of different severities^{44, 45}. This is due to PEF essentially evaluating the large calibre airway. In children this can constitute an unrealistic expectation; in addition to the weak adherence, we are faced with the possibility of adulterated results, if the device is hand held.

Dissimilar correlations between the FE_{NO} and spirometry are found in the literature^{46, 47, 48}, tending to be weak in the greater part of the studies. In the light of that stated above, given the inexistence of spirometry abnormalities in the majority of asthmatics and the limitations to outpatients' PEF measurement and treating asthma as an inflammatory disease, FE_{NO} measurement should be part of an asthmatic's evaluation, particularly in cases of allergic asthma. This measurement is, like spirometry, an exam that is reproducible and simple to perform. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airway characterised by a hyperresponsiveness to diverse stimuli. Bronchial hyperresponsiveness is a physiopathological characteristic of asthma that may explain many of its manifestations. This property may be evaluated through bronchoconstriction tests, with methacholine the substance most frequently used. While the idea is simplistic – the greater the bronchial hyperresponsiveness, the more severe the asthma – there is a great disparity between the clinical severity of the asthma and the severity of the bronchial hyperresponsiveness^{49, 50}. In paediatric studies, around 1/3 of the children with marked bronchial hyperresponsiveness did not need any medication^{51, 52}. In terms of

O estudo da função pulmonar na asma permite uma avaliação da gravidade, reversibilidade e variabilidade da limitação do débito aéreo

Não é descabido que a medição do FE_{NO} seja incluída na avaliação de um doente asmático, nomeadamente se for alérgico

As correlações entre o FE_{NO} e a espirometria encontradas na literatura são díspares^{46,47,48}, sendo contudo em grande parte dos trabalhos tendencialmente baixas. Pelo que foi dito, dada a inexistência de alterações espirométricas em grande parte dos asmáticos, dadas as limitações que a medição ambulatória do PEF apresenta e tratando-se a asma de uma doença inflamatória, não é descabido que a medição do FE_{NO} seja incluída na avaliação de um doente asmático, nomeadamente se for alérgico. Tal como a espirometria, é um exame reprodutível e de execução simples.

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas caracterizada por uma hiperreatividade a diversos estímulos. A hiperreatividade brônquica é uma característica fisiopatológica da asma que pode explicar muitas das suas manifestações. Esta propriedade pode ser avaliada através de provas de broncoconstrição, sendo a metacolina a substância mais frequentemente utilizada. Apesar da ideia simplista de que quanto maior a hiperreatividade brônquica maior será a gravidade da asma, existe uma disparidade considerável entre a gravidade clínica da asma e a gravidade da reatividade brônquica^{49,50}. Em estudos pediátricos, cerca de 1/3 das crianças com hiperreatividade brônquica marcada não precisava de qualquer medicação^{51,52}. Relativamente a correlações com o FE_{NO}, foi demonstrada por alguns autores que a hiperreatividade brônquica à metacolina apresenta uma boa correlação com este biomarcador^{53,54}. Outros não encontraram qualquer correlação^{55,56}.

Conclusão

Na avaliação de crianças com asma, o estudo da função pulmonar é muitas das vezes normal, apesar dos sintomas referidos pelo doente. A ausência de uma relação forte entre o

FE_{NO} correlações, while several authors have shown that bronchial hyperresponsiveness to methacholine has a good correlation with this biomarker^{53, 54}, others have found no correlation^{55, 56}.

Conclusion

In evaluating children with asthma, the lung function study is very often normal, despite patients' symptoms. The lack of a strict relation between the FE_{NO} and the bronchial obstruction/response to bronchodilator suggests that lung function abnormalities and bronchial inflammation are different aspects of asthma, not necessarily found together. We highlight that the characteristics that suggest untreated asthma are better associated to the FE_{NO} than to spirometry.

FE_{NO} is described as a non-invasive marker of bronchial inflammation. Higher values are found in children with allergic asthma, even when the role FE_{NO} plays in children with non-allergic asthma is not yet well established. We highlight that our results, and those of other authors⁴⁸, suggest that these children present values markedly lower than those found in children sensitised to aeroallergens.

While there are no established cut-offs, it is agreed that a raised FE_{NO} value in a patient with a clinical history suggesting asthma indicates that anti-inflammatory bronchial treatment would be beneficial⁵⁷.

However, and seeing that there are as yet no agreed FE_{NO} reference values, we stress that a series of measurements made over time, capable of determining what constitutes a significant variation for the individual patient, are more important than an isolated measurement. Thus, the FE_{NO} allows an ob-

FE_{NO} e a obstrução brônquica/resposta ao broncodilatador sugere que as alterações da função pulmonar e da inflamação brônquica são aspectos diferentes da asma, que não coexistem obrigatoriamente. É de realçar que as características que sugerem a ausência de controlo da asma se associaram melhor com o FE_{NO} de que com a espirometria.

O FE_{NO} tem sido proposto como um marcador não invasivo da inflamação brônquica. Valores aumentados são encontrados em crianças com asma alérgica, não estando ainda bem estabelecido o papel do FE_{NO} em crianças com asma não alérgica. Os nossos resultados, tal como o de outros autores⁴⁸, sugerem que estas crianças apresentarão valores bastante inferiores comparativamente às que se encontram sensibilizadas a aeroalergénios, chamando-se a atenção para este facto.

Apesar de não se encontrarem estabelecidos *cutoffs*, é consensual que um valor aumentado de FE_{NO} num doente com uma história clínica sugestiva de asma, apontará para um benefício de tratamento com terapêutica anti-inflamatória brônquica⁵⁷.

Contudo, e dado não existirem ainda valores de referência consensuais para o FE_{NO}, lembramos que mais importante do que uma medição isolada serão várias medições ao longo do tempo, capazes de determinar o que constitui uma variação importante do doente. Desta maneira, o FE_{NO} permitirá uma avaliação objectiva e sensível da inflamação não alcançada até à data com os meios de estudo da função respiratória convencionais. O presente trabalho encontra-se inserido num estudo longitudinal que se debruçará também sobre esta questão.

Financiamento: Fundação Calouste Gulbenkian, Projecto Saud'AR
FEDER/ POCTI

jective assessment sensitive to inflammation, something not as yet achievable using conventional respiratory function study tools. Our paper is part of a longitudinal study into this question.

Financial support from the Calouste Gulbenkian Foundation, Saud'AR Project
FEDER/POCTI

É consensual que um valor aumentado de FE_{NO} num doente com uma história clínica sugestiva de asma apontará para um benefício de tratamento com terapêutica anti-inflamatória brônquica

Bibliografia/Bibliography

1. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000 ;27(4):313-9.
2. Alving K, Fornhem C, Lundberg JM. Pulmonary effects of endogenous and exogenous nitric oxide in the pig: relation to cigarette smoke inhalation. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 739-46.
3. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181(2): 852-7.
4. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-70.
5. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-5.
6. Araújo Gonçalves P, Lopes da Mata P, Neuparth N, Bensabat Rendas A. Papel do óxido nítrico como marcador de inflamação em doenças respiratórias. *Rev Port Pneumol* 2000; 6 (4): 309-318.
7. Neuparth N, Gamboa T, Bugalho de Almeida A, Caires A, Rosado Pinto J, Rendas AB. Relation between exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during induced maximal airway narrowing in asthma. *Eur Respir J* 1998; 12 (S28): 364s.
8. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. *ERS TASK FORCE REPORT* – Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10: 1683-93
9. Barreto M, Villa MP, Martella S, Ronchetti F, Darder MT, Falasca C, Pagani J, Massa F, Ronchetti R. Exhaled nitric oxide in asthmatic and non-asthmatic children: influence of type of allergen sensitization and exposure to tobacco smoke. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12 (5):247-56.
10. Cardinale F, de Benedictis FM, Muggeo V, Giordano P, Loffredo MS, Iacoviello G, Armenio L. Exhaled nitric oxide, total serum IgE and allergic sensitization in childhood asthma and allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16(3):236-42.
11. van Amsterdam JG, Janssen NA, de Meer G, Fischer PH, Nierkens S, van Loveren H, Opperhuizen A, Steerenberg PA, Brunekreef B. The relationship between exhaled nitric oxide and allergic sensitization in a random sample of school children. *Clin Exp Allergy* 2003;33(2):187-91.
12. Spanier AJ, Hornung R, Lierl M, Lanphear BP. Environmental exposures and exhaled nitric oxide in children with asthma. *J Pediatr* 2006;149 (2):220-6.
13. Buchvald F, Barladi E, Carraro S, *et al.* Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1130-6.
14. Santamaria F, Montella S, De Stefano S, Sperli F, Barbarano F, Valerio G. Relationship between exhaled nitric oxide and body mass index in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1163-4.
15. de Winter-de Groot KM, van der Ent CK, Prins I, Tersmette JM, Uiterwaal CSPM. Exhaled nitric oxide: the missing link between asthma and obesity? *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 419-20.
16. Tsang KW, Ip SK, Leung R, *et al.* Exhaled nitric oxide: the effects of age, gender and body size. *Lung* 2001; 179: 83-91.
17. Olin AC, Rosengren A, Thelle D, Lissner L, Bake B, Torén K. Sample Height, Age, and Atopy Are Associated With Fraction of Exhaled Nitric Oxide in a Large Adult General Population. *Chest* 2006;130 (5):1319-25.
18. Olin AC, Bake B, Torén K. Fraction of exhaled nitric oxide at 50 mL/s: reference values for adult life-long never-smokers. *Chest* 2007 ;131(6):1852-6.
19. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(8):912-30.
20. Taylor R, Pijnenburg M, Smith AD, Jongste JCD. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax* 2006;61:817-827.
21. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J* 2003; 21: 433-8.
22. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, *et al.* Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:473-8.
23. Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax* 2003; 58: 494-9.
24. Prasad A, Langford B, Stradling JR, Ho LP. Exhaled nitric oxide as a screening tool for asthma in school children. *Respir Med* 2006; 100 (1): 167-73.

25. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, *et al.* Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002; 57: 383-7.
26. Lopes C, Fonseca J, Moreira da Silva J, Castel-Branco MG. Óxido nítrico exalado: utilização clínica na asma. *Rev Port Imunoalergol* 2005; 13(1):7-17.
27. Costa F, Arrobas A. Óxido nítrico exalado no diagnóstico de asma. *Rev Port Imunoalergologia* 2007; 15(2): 163-77.
28. Pellegrino R, Viegi, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26:948-68.
29. Dundas I, McKenzie S. Spirometry in the diagnosis of asthma in children. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12 (1):28-33.
30. Spergel JM, Fogg MI, Bokszczanin-Knosala A. Correlation of exhaled nitric oxide, spirometry and asthma symptoms. *J Asthma* 2005;42(10):879-83.
31. Colon-Semidey AJ, Marshik P, Crowley M, Katz R, Kelly HW. Correlation between reversibility of airway obstruction and exhaled nitric oxide levels in children with stable bronchial asthma. *Pediatric Pulmonol* 2000; 30(5):385-92.
32. Zietkowski Z, Bodzenta-Lukaszyk A, Tomasiak MM, Skiepkó R, Szmitkowski M. Comparison of exhaled nitric oxide measurement with conventional tests in steroid-naive asthma patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16(4):239-46.
33. Rosias P, Dompelling E, Dentener M, Pennings HJ, Hendriks H, Van Iersel M, Jöbsis Q. Childhood asthma: exhaled markers of airway inflammation, asthma control score and lung function tests. *Pediatric Pulmonology* 2004; 38: 107-114.
34. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (Revisão 2006): Global Initiative for Asthma (GINA). URL: <http://www.ginasthma.org>; 2006.
35. Alving K, Jansson C, Nordvall L. Performance of a new hand-held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children. *Respiratory Research* 2006;7:67.
36. McGill C, Malik G, Turner SW. Validation of a hand-held exhaled nitric oxide analyzer for use in children. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(11):1053-7.
37. Menzies D, Nair A, Lipworth B. Portable Exhaled Nitric Oxide Measurement: Comparison With the "Gold Standard" Technique. *Chest* 2007;131:410-414.
38. Martins P, Caires I, Torres S, Borrego C, Neuparth N. Reproducibility of eNO measurements in children using a hand-held analyser. *Eur Respir J* 2006; 28 (S50): 791s.
39. Martins P, Caires I, Torres S, Neuparth N. Óxido nítrico no ar exalado: comparação de medições com dois analisadores. *Rev Port Pneumol* 2006; 12 (Supl.1):91.
40. Martins P, Caires I, Rosado Pinto J, Neuparth N. Óxido nítrico no ar exalado: comparação das medidas com dois analisadores. *Rev Port Imunoalergologia* 2006; 14 (Supl3): 55.
41. Quackenboss JJ, Lebowitz MD, Krzyzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates. Relationship to symptoms and respiratory disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:323-30.
42. Jain P, Kavuru MS, Emerman CL, Ahmad M. Utility of peak expiratory flow monitoring. *Chest* 1998; 114:861-76.
43. Kerstjens HA, Brand PL, de Jong PM, Koeter GH, Postma DS. Influence of treatment on peak expiratory flow and its relation to airway hyperresponsiveness.
44. Kunzli N, Stutz EZ, Perruchoud AP, *et al.* Peak flow variability in the SAPALDIA study and its validity in screening for asthma-related conditions. The SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:427-34.
44. Troyanov S, Ghezzi H, Cartier A, Malo JL. Comparison of circadian variations using FEV1 and peak expiratory flow rates among normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1994; 49:775-80.
46. Gandhi R, Blaiss M. What are the best estimates of pediatric asthma control? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6:106-12
47. Sippel J, Holden W, Tilles S *et al.* Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:645-50.
48. Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Fregonese L, Battistini E, Biraghi MG, Rossi GA. Correlations between exhaled nitric oxide levels, blood eosinophilia, and airway obstruction reversibility in childhood asthma are detectable only in atopic individuals. *Pediatric Pulmonol* 2003;35(5):358-63.
49. Godfrey S, Springer C, Bar-Yishay E, Avital A. Cut-off points defining normal and asthmatic bronchial reactivity to exercise and inhalation challenges in children and young adults. *Eur Respir J* 1999; 14:659-68.

50. Britton J, Tattersfield AE. Does measurement of bronchial hyperreactivity help in the clinical diagnosis of asthma? *Eur J Respir Dis* 1986; 68:233-8.
51. Burrows B, Sears M, Flanneery E, Herbison G, Holdaway M, Silva P. Relation of the course of bronchial responsiveness from age 9 to age 15 to allergy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1302-8.
52. Gautrin D, Lapierre JG, Malo JL, Infante-Rivard C. Airway hyperresponsiveness and symptoms of asthma in a six-year follow-up study of childhood asthma. *Chest* 1999; 116:1659-64.
53. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, Ligabue G, Ciaccia A, Saetta M, Papi A. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(3):418-24.
54. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53(2):91-5.
55. Olin AC, Ljungkvist G, Bake B, Hagberg S, Henriksson L, Toren K. Exhaled nitric oxide among pulp-mill workers reporting gassing incidents involving ozone and chlorine dioxide. *Eur Respir J* 1999; 14(4):828-31.
56. Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, Brusasco V, Rossi GA. Dissociation between exhaled nitric oxide and hyperresponsiveness in children with mild intermittent asthma. *Thorax* 2000; 55(6):484-8.
57. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C, MontiSheehan G, *et al.* Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 453-9.