

Óxido nítrico exalado no diagnóstico de asma

Exhaled nitric oxide in asthma diagnosis

Rev Port Imunoalergologia 2007; 15 (2): 163-177

Filipa Costa¹, Ana Arrobas²

¹ Interna do Internato Complementar de Pneumologia / *Pulmonology resident*

² Assistente Hospitalar Graduada de Pneumologia / *Pulmonology consultant*

Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de Coimbra. Director: Dr. Jorge Pires
Pulmonology Unit, Centro Hospitalar de Coimbra. Director: Dr. Jorge Pires

RESUMO

Introdução: O diagnóstico de asma tem-se baseado em avaliações convencionais que associam a sintomatologia obstrutiva à existência de obstrução brônquica com reversibilidade ao broncodilatador (BD) inalado e/ou a testes de bronco-provocação farmacológica positivos. Recentemente surgiu um novo método baseado na avaliação da inflamação das vias aéreas: a medição do óxido nítrico no ar exalado (FE_{NO}), que apresenta relativamente aos métodos tradicionais a vantagem de ser mais rápido, simples, não invasivo e reproduzível. **Objectivos:** O objectivo do estudo foi avaliar a aplicabilidade do FE_{NO} no diagnóstico de asma e determinar qual o ponto de *cut-off* que permite uma maior precisão diagnóstica. **Material e métodos:** Neste estudo retrospectivo, foram incluídos os doentes referenciados às Consultas de Alergologia e Pneumologia Geral do Centro Hospitalar de Coimbra com sintomas sugestivos de asma no período de 1/7/2005 a 31/6/2006. Foram excluídos os doentes sob corticoterapia, fumadores ou que não apresentaram informação clínica ou exames complementares de diagnóstico completos. De acordo com os critérios internacionais (sintomas/sinais, estudo funcional respiratório, resposta ao BD inalado e testes de provocação brônquica com metacolina), dividiram-se os doentes em asmáticos e não asmáticos e avaliaram-se os níveis de FE_{NO} nos dois grupos. **Resultados:** Incluíram-se 182 doentes (118 do sexo feminino) com média de idades de 33,6 anos, 109 dos quais com critérios de asma segundo os métodos tradicionais. A média dos valores de FE_{NO} no grupo dos doentes asmáticos foi de 60,5 ppb e no dos não asmáticos de 21,4 ppb, apresentando esta diferença entre médias um valor estatisticamente significativo ($p < 0,0005$). O ponto de *cut-off* do FE_{NO} que mostrou a melhor combinação entre sensibilidade (83,4%) e especificidade (84,9%) foi de 33 ppb. **Conclusões:** Os

resultados obtidos revelaram que o FE_{NO} é um bom método auxiliar no diagnóstico de asma, apresentando níveis aceitáveis de especificidade e sensibilidade. Os valores de *cut-off* que permitem a distinção entre asmáticos e doentes com outras patologias são ligeiramente superiores aos valores de *cut-off* para indivíduos normais.

Palavras-chave: Asma, óxido nítrico exalado.

ABSTRACT

Introduction: The diagnosis of asthma is based on conventional measurements such as symptom scores reported by the patient, measurements of airway obstruction and bronchodilator response and/or bronchial challenge tests to assess bronchial hyperresponsiveness. Recently a new method of asthma diagnosis based on the evaluation of airway inflammation has emerged: the measurement of fractional exhaled nitric oxide (FE_{NO}). Measuring FE_{NO} is non-invasive and simpler, faster and reproducible in comparison to conventional methods. **Aims:** The aim of the study was to evaluate the use of FE_{NO} in the diagnosis of asthma and to determine the cut-off point that allows a higher diagnostic accuracy. **Material and Methods:** In this retrospective study, we included all Allergology and Pulmonology outpatients at the Centro Hospitalar de Coimbra with symptoms suggestive of asthma during the period 1/7/2005 - 31/6/2006. We excluded patients already on corticosteroids, patients who were smokers and patients who did not have full clinical information or all the necessary tests. Following current international guidelines (symptoms, respiratory function, response to inhaled bronchodilator and bronchial challenge tests), we divided the patients into two groups, asthmatics and non-asthmatics and evaluated the FE_{NO} levels in both groups. **Results:** We had a population of 182 patients; 118 females and 64 males with a mean age of 33.6 years. 109 patients met the criteria for a diagnosis of asthma according to international guidelines. The mean FE_{NO} level in the asthmatic group was 60.5 ppb vs. 21.4 ppb in the non-asthmatic group. This difference attained statistical significance ($p < 0.0005$). The FE_{NO} cut-off level with the best sensitivity (83.4%) / specificity (84.9%) ratio was 33 ppb. **Conclusions:** Our results show that FE_{NO} can be used as an additional diagnostic tool for the screening of suspected asthma and has acceptable sensitivity and specificity levels. The cut-off levels that allow a better distinction between asthmatics and non-asthmatics are slightly higher than for normal individuals.

Key-words: Asthma, exhaled nitric oxide.

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas caracterizada pela presença de células inflamatórias e pela libertação de vários mediadores inflamatórios nas vias aéreas. Esta inflamação origina sintomas respiratórios recorrentes (tosse, pieira, dificuldade

INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterised by the presence of inflammatory cells and the liberation of several inflammatory mediators in the airways. This inflammation causes recurrent respiratory symptoms (cough, wheezing,

respiratória), num fundo de hiperreactividade a estímulos externos, dando origem a graus variáveis de obstrução ao fluxo aéreo que é reversível espontaneamente ou em resposta ao tratamento.

O diagnóstico e a monitorização da asma têm-se baseado em avaliações convencionais, tal como são referidas nas recomendações internacionais: sintomas, medição da obstrução das vias aéreas pelo PEF (*peak expiratory flow*) ou pelo FEV₁ (*forced expiratory volume on the first second*), avaliação da resposta ao broncodilatador inalado e avaliação da hipersensibilidade brônquica através de testes de provocação brônquica. O diagnóstico é feito quando se associam sintomas característicos à obstrução reversível das vias aéreas. Quando persistem dúvidas, o diagnóstico pode ser confirmado pela existência de hipersensibilidade brônquica a fármacos como a histamina ou metacolina. No entanto, a sintomatologia está muito dependente da percepção individual de cada doente, havendo risco de os sintomas serem subvalorizados ou sobrevalorizados¹. A monitorização individual do PEF necessita da cooperação em produzir expirações máximas e em realizar as medições diariamente durante algumas semanas. Quanto ao restante estudo funcional respiratório, embora a inflamação das vias aéreas se possa reflectir no grau de obstrução, a relação entre os testes da função pulmonar e os índices objectivos de inflamação não são lineares². Além disso, os doentes com formas mais ligeiras de asma podem ter valores normais de FEV₁. Os testes de provocação brônquica com metacolina ou histamina são um método diagnóstico fiável para avaliar a hipersensibilidade das vias aéreas, mas são caros, demorados, apresentam um pequeno risco de induzir broncospasmo grave e a relação com o grau de inflamação não é constante^{3,4,5}.

Como a inflamação é uma característica central da asma, medi-la poderá ser uma forma mais adequada de fazer o diagnóstico e a monitorização da doença. Até há pouco tempo existiam apenas métodos invasivos para avaliar a presença de células e mediadores inflamatórios nos tecidos e fluidos brônquicos. Mais recentemente, surgiu a análise da expectoração induzida, um método não invasivo

(dyspnea) within the context of hyperresponsiveness to external stimuli, giving rise to varying degrees of airway obstruction which reverses spontaneously or in response to treatment.

Asthma diagnosis and monitoring is based on conventional evaluation as described in international guidelines: symptoms, measuring the degree of airway obstruction using PEF (Peak Expiratory Flow) or FEV₁ (Forced Expiratory Volume on the first second), evaluating inhaled bronchodilator response and evaluating bronchial hypersensitivity through bronchial challenge tests. Diagnosis is made when there is an association of characteristic symptoms and demonstration of reversible airway obstruction. In cases of doubt, diagnosis can be confirmed by the existence of bronchial hypersensitivity to drugs such as histamine or methacholine. Reported symptom scores depend greatly, however, on each patient's individual perception, with the risk of symptoms being over or undervalued¹. Individual monitoring of PEF needs patient cooperation to produce maximum expirations and to take daily measurements over several weeks. In considering the remaining respiratory function tests, while inflammation of the airways can influence the degree of airway obstruction, there is no linear relationship between lung function tests and objective indexes of inflammation². Furthermore, patients with milder forms of asthma can have a normal FEV₁. While bronchial challenge tests with histamine or methacholine are a reliable diagnostic method for evaluating airway hypersensitivity, they are costly, time-consuming and carry a slight risk of inducing severe bronchospasm. In addition, there is not a constant relationship with the degree of inflammation^{3,4,5}.

As inflammation is a main characteristic of asthma, measuring it might be the most suitable way to diagnose and monitor the disease. Until recently, only invasive methods existed to assess if inflammatory cells and mediators were present in bronchial tissues and fluids. The induced sputum analysis method, a non-invasive technique that supplies information on inflammation of the lower airways, has recently appeared. This induced sputum method can,

que fornece informação acerca da inflamação das vias aéreas inferiores. No entanto, a indução da expectoração pode produzir diminuição temporária da função respiratória e o processamento das amostras é moroso, dispendioso e necessita de técnicos especializados. Assim, a aplicação destes métodos torna-se difícil na prática clínica diária, não sendo por isso usados como rotina.

Mais recentemente, a medição do FE_{NO} tem sido proposta como um método simples, rápido e não invasivo para avaliar a inflamação das vias aéreas. Nos doentes asmáticos, encontra-se um aumento dos níveis de FE_{NO} , mesmo nos casos de asma mais ligeira. Os níveis de FE_{NO} variam paralelamente com o processo inflamatório na via aérea^{6,7} e diminuem com a administração de fármacos anti-inflamatórios, como os corticosteróides⁸. No entanto, encontram-se valores elevados de FE_{NO} noutras patologias, nomeadamente rinite, sinusite, infecções respiratórias, bronquiectasias, mas não na DPOC nem na fibrose quística^{9,10}. Os níveis de FE_{NO} são também mais baixos em doentes fumadores relativamente aos não fumadores¹¹.

OBJECTIVOS

O objectivo do estudo foi avaliar a utilidade do FE_{NO} no diagnóstico de asma e determinar qual o ponto de *cut-off* que permite uma maior precisão diagnóstica em doentes com sintomas respiratórios sugestivos de asma.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes

Neste estudo retrospectivo foram incluídos todos os doentes referenciados às consultas de Alergologia Respiratória e Pneumologia Geral do Centro Hospitalar de Coimbra com sintomas sugestivos de asma (dispneia, pieira e/ou tosse) durante o período de 1/7/2005 a 30/6/2006 e que realizaram todos os exames complementares de diagnóstico necessários para avaliação da existência de

however, lead to temporarily reduced lung function and processing the samples is a lengthy and costly process which calls for trained technicians. All of this makes a daily routine clinical practice application of these methods difficult and, as such, they are not part of clinical routine.

More recently, measuring FE_{NO} has been suggested as a simple, quick and non-invasive method for evaluating airway inflammation. FE_{NO} levels are increased in asthmatic patients, even in patients with only very mild asthma. FE_{NO} levels vary in parallel to inflammation of the airways^{6,7} and decrease with the administration of anti-inflammatory drugs such as corticosteroids⁸. Raised FE_{NO} levels are also seen in other pathologies such as rhinitis, sinusitis, respiratory infections and bronchiectasis but not in COPD or cystic fibrosis^{9,10}. FE_{NO} levels are also lower in patients who smoke than in non-smoker patients¹¹.

AIMS

The aim of the study was to evaluate the use of FE_{NO} in the diagnosis of asthma and to determine the cut-off point which allows a higher diagnostic accuracy in patients with respiratory symptoms suggestive of asthma.

MATERIAL AND METHODS

Patients

In this retrospective study, we included all Allergology and Pulmonology outpatients at the Centro Hospitalar de Coimbra with symptoms suggestive of asthma (dyspnea, wheezing and/or cough), during the period 1/7/2005 - 31/6/2006, who had undergone all the complementary diagnostic tests to assess the presence of asthma. These exams were basal lung function study, response to inhaled bronchodilator, bronchial challenge test with drugs (if necessary) and FE_{NO} . We excluded the patients who smoked, those who were on corticosteroids, those who had not undergone all the necessary com-

asma (estudo funcional respiratório basal, avaliação da resposta ao broncodilatador inalado e, se necessário, teste de provocação brônquica com fármacos, e FE_{NO}).

Foram excluídos os doentes fumadores, sob corticoterapia e aqueles que não tivessem realizado todos os exames complementares de diagnóstico necessários ou que não tivessem informação clínica suficiente no seu processo clínico.

Desenho do estudo e métodos

Nos doentes incluídos, por revisão dos processos clínicos, foi avaliada a história clínica, o estudo funcional respiratório, a resposta ao broncodilatador inalado, o teste de provocação brônquica farmacológica com metacolina e o FE_{NO} . Em alguns casos tinham sido realizados outros exames complementares de diagnóstico para determinar a causa dos sintomas respiratórios e que foram também avaliados.

Os doentes foram classificados em asmáticos ou não asmáticos com base na presença de uma resposta positiva ao broncodilatador (FEV_1 com reversibilidade ao broncodilatador superior a 12%) e/ou um teste de provocação brônquica farmacológica com metacolina positivo (queda de 20% no FEV_1 após inalação de uma dose de metacolina $\leq 7,6 \mu\text{mol}$). O valor do FE_{NO} foi posteriormente avaliado nos dois grupos.

Os estudos espirométricos foram realizados utilizando um pneumotacógrafo SensorMedics® 2400, de acordo com as normas da ATS¹². Os estudos de provocação brônquica foram realizados utilizando metacolina em doses crescentes pelo método do dosímetro, de acordo com as normas internacionais¹³.

O FE_{NO} foi medido antes de ter sido realizada qualquer manobra expiratória forçada e utilizando um aparelho EcoMedics® CLD88sp (Figura 1) pelo método *single breath*, tendo por base as normas da ERS e ATS¹⁴. Partindo da capacidade pulmonar total, os doentes realizaram uma expiração lenta até à capacidade vital (com um fluxo expiratório de 50 mL/s) contra uma resistência expiratória. O ar exalado foi continuamente avaliado e o FE_{NO} medido na fase de *plateau*. Realizaram-se três medições reprodutíveis (valor de *plateau* não diferindo mais

plementary diagnostic tests or those who did not have sufficient clinical information in their clinical files.

Study design and methods

Patients' clinical files were scrutinised for their clinical history and results of lung function studies, response to inhaled bronchodilators, results of the pharmacological bronchial challenge test with methacholine and FE_{NO} . In some cases, further complementary diagnostic tests had been carried out to determine the cause of the respiratory symptoms and these tests were also evaluated.

Patients were classified as asthmatic or non-asthmatic based on a positive response to the bronchodilator (FEV_1 with bronchodilator reversibility above 12%) and/or a positive pharmacological bronchial challenge test with methacholine (drop of 20% in FEV_1 after inhalation of a dose of methacholine $\leq 7.6 \mu\text{mol}$). The FE_{NO} level in both groups was evaluated at a posterior date.

Spirometry tests were carried out using a SensorMedics® 2400 pneumotacograph, in accordance with ATS guidelines¹². Bronchial challenge studies were undertaken using increasing doses of methacholine administered using a dosimeter, in accordance with international guidelines¹³.

FE_{NO} was measured prior to any forced expiratory manoeuvre being carried using EcoMedics® CLD88sp apparatus (Fig. 1) and the single breath method, in accordance with ERS and ATS guidelines¹⁴. Starting from total lung capacity, the patients underwent a slow expiration until vital capacity (with expiratory flow 50 mL/s) against expiratory resistance. The exhaled air was continuously measured and the FE_{NO} measured at plateau stage. Three reproducible measurements were taken (plateau value not differing more than 10%), with the mean of these three used for the study. The reference values for the normal population used in our laboratory were <16 ppb (value supplied by the equipment manufacturers).

Comparison of the asthmatic and non-asthmatic group was made using the Mann-Whitney test for non-parametric data, with a value of $p < 0.05$ taken as statistically significant.



Figura 1. Analisador de NO EcoMedics® CLD88sp
Figure 1. EcoMedics® CLD88sp NO analyser

do que 10%) e a média dos três valores foi utilizada para o estudo. Os valores de referência para a população normal usados no nosso laboratório são <16 ppb (valor fornecido pelo fabricante do aparelho).

A comparação entre o grupo de asmáticos e o de não asmáticos foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney para dados não emparelhados, sendo um valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Elaboraram-se tabelas dupla entrada para diferentes valores de *cut-off* de FE_{NO} (superior ou igual vs inferior ao valor de *cut-off*) vs diagnóstico de asma, para cálculo dos verdadeiros positivos (VP), falsos positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falsos negativos (FN) (Quadro 1).

Quadro 1. Tabelas de dupla entrada utilizadas para cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e exactidão diagnóstica

	Asmático	Não asmático
≥ valor de <i>cut-off</i>	Verdadeiros positivos	Falsos positivos
< valor de <i>cut-off</i>	Falsos negativos	Verdadeiros negativos

We created double entry tables for different FE_{NO} cut-off values (above or equal to vs. below the cut-off value) vs. asthma diagnosis, in order to calculate the true positives (TP), false positives (FP), true negatives (TN) and false negatives (FN) (Table I). Based on these, we calculated the sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (A), in accordance with the following formulas: $S = TP / (TP + FN)$, $Sp = TN / (TN + FP)$, $PPV = TP / (TP + FP)$, $NPV = TN / (TN + FN)$, $A = (TP + TN) / \text{patient total}$.

RESULTS

Patient characteristics

223 patients with symptoms suggestive of asthma were referred to Allergology and General Pulmonology outpatients' appointments during the period of analysis. 23 of these were excluded as they were already taking corticosteroids. 12 were excluded as they were smokers and 6 for inexistence of sufficient information in clinical files or for not having undergone all necessary complementary diagnostic examinations.

The total comprised 182 patients, mean age 33.6 years old (minimum 18 and maximum 75 years old), 118 (64.8%) of whom were female. All these patients presented symptoms suggestive of asthma (Fig 2) and half of them also presented other symptoms, including ocular, nasal or cutaneous symptoms.

In accordance with the complementary diagnostic tests performed, the patients were classified into two groups: asthmatics if they presented positive response to inhaled bronchodi-

Table I. Double entry tables used to calculate sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy

	Asthmatic	Non asthmatic
≥ cut-off value	True positives	False positives
< cut-off value	False negatives	True negatives

Com base nestes valores, calculou-se a sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e exactidão diagnóstica (ED) de acordo com as seguintes fórmulas: $S = VP / (VP + FN)$, $E = VN / (VN + FP)$, $VPP = VP / (VP + FP)$, $VPN = VN / (VN + FN)$, $ED = (VP + VN) / \text{total de doentes}$.

RESULTADOS

Características dos doentes

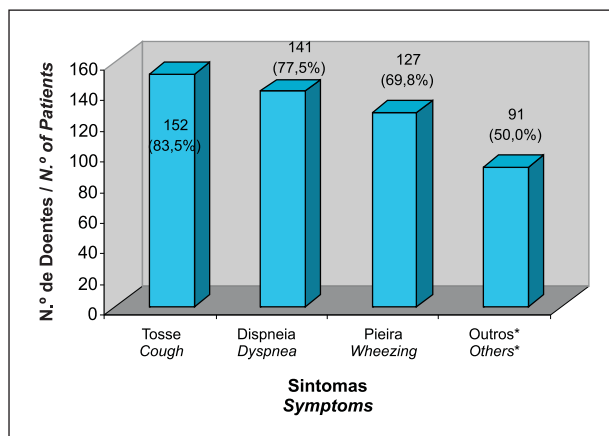
No período em análise foram referenciados, às consultas de Alergologia e Pneumologia Geral, 223 doentes com sintomas sugestivos de asma. Destes, 23 foram excluídos porque se encontravam já sob corticoterapia, 12 excluídos por serem fumadores e 6 por não apresentarem informação clínica suficiente no processo clínico ou por não terem realizado todos os exames complementares de diagnóstico necessários.

Incluíram-se no total 182 doentes, com média de idades de 33,6 anos (mínimo 18 e máximo 75 anos), 118 (64,8%) dos quais pertencentes ao sexo feminino. Todos os doentes incluídos apresentavam sintomas sugestivos de asma (Figura 2). Metade dos doentes apresentava também outros sintomas, que incluíam sintomas oculares, nasais ou cutâneos.

De acordo com os exames complementares de diagnóstico realizados, classificaram-se os doentes em asmáticos se apresentaram resposta positiva ao broncodilatador inalado e/ou hiperreactividade brônquica, ou em não asmáticos se ambos os exames foram negativos. No Quadro 2 apresentam-se as características demográficas e parâmetros espirométricos dos dois grupos.

No grupo dos doentes asmáticos, classificou-se a gravidade da asma de acordo com os critérios do GINA¹⁵ (Figura 3).

No grupo dos doentes não asmáticos, os exames complementares de diagnóstico realizados permitiram concluir por diagnósticos diversos (Quadro 3).



* Sintomas nasais, oculares ou cutâneos
* Nasal, ocular or cutaneous symptoms

Figura 2. Sintomatologia apresentada pelos doentes
Figure 2. Symptoms presented by patients

lator and/or bronchial hyperresponsiveness and non-asthmatics if both exams were negative. Table 2 shows the demographic characteristics and spirometry parameters of the two groups.

The severity of asthma in the asthmatic patients was classified in accordance with the GINA criteria¹⁵ (Fig 3).

The complementary diagnostic exams carried out in the non-asthmatic patient group allowed several different diagnoses (Table 3).

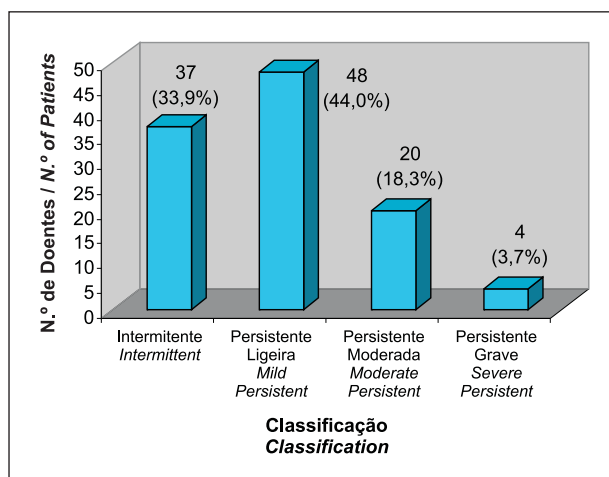


Figura 3. Classificação da asma segundo GINA
Figure 3. GINA asthma classification

Quadro 2. Características demográficas e parâmetros espirométricos dos doentes (os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão)

	Asmáticos (n=109)	Não asmáticos (n=73)	Valor p
Idade (anos)	31,2 ± 13,8	37,3 ± 15,5	–
Sexo (M:F) %	36%:64%	34%:66%	–
FEV1 (L)	2,9 ± 0,9	3,0 ± 0,8	0,134
FEV1 (%)	94,0 ± 17,2	105,3 ± 18,2	<0,0005
FVC (L)	4,0 ± 2,1	3,8 ± 1,0	0,143
FVC (%)	107,4 ± 13,6	110,8 ± 17,3	0,086
FEV1/FVC (%)	76,0 ± 11,9	81,2 ± 7,7	<0,0005

Table 2. Patients' demographic characteristics and spirometry parameters (values given as mean ± standard deviation)

	Asthmatic (n=109)	Non-asthmatic (n=73)	p value
Age (years)	31.2 ± 13.8	37.3 ± 15.5	–
Gender (M:F) %	36%:64%	34%:66%	–
FEV1 (L)	2.9 ± 0.9	3.0 ± 0.8	0.134
FEV1 (%)	94.0 ± 17.2	105.3 ± 18.2	<0.0005
FVC (L)	4.0 ± 2.1	3.8 ± 1.0	0.143
FVC (%)	107.4 ± 13.6	110.8 ± 17.3	0.086
FEV1/FVC (%)	76.0 ± 11.9	81.2 ± 7.7	<0.0005

Quadro 3. Diagnósticos no grupo de doentes não asmáticos

Diagnóstico	N.º de Doentes
Rinite	34
DPOC	8
Hiperreactividade das vias aéreas pós-infecciosa	7
Sinusite	4
Sarcoidose	3
Disfunção das cordas vocais	2
Insuficiência cardíaca	2
Silicose	2
Fibrose pulmonar	2
Traqueobronquite infecciosa	2
Tosse psicogénica	2
Tosse provocada por IECA	2
BOOP	1
Défice de alfa 1-antitripsina	1
Polipose nasal	1
Total	73

Table 3. Diagnoses of the non-asthmatic patient group

Diagnosis	N.º of Patients
Rhinitis	34
COPD	8
Post-infection hyperresponsiveness of the airways	7
Sinusitis	4
Sarcoidosis	3
Vocal chord dysfunction	2
Cardiac failure	2
Silicosis	2
Pulmonary fibrosis	2
Infectious tracheobronchitis	2
Psychogenic cough	2
ACEI induced cough	2
BOOP	1
Alpha-1 antitrypsin deficiency	1
Nasal polyposis	1
Total	73

Valores de FE_{NO}

Os valores do FE_{NO} obtidos nos doentes asmáticos e não asmáticos apresentam-se na Figura 4. A média dos valores de FE_{NO} no grupo dos doentes asmáticos foi significativamente superior à dos não asmáticos: 60,5 ppb (32-89 ppb para um intervalo de confiança de 95%) vs 21,4 ppb (5,4-37,4 ppb para um intervalo de confiança de 95%), apresentando esta diferença entre médias significado estatístico ($p < 0,0005$) (Figura 5).

Na análise dos valores de FE_{NO} dos doentes asmáticos segundo a gravidade da asma (Quadro 4) verificou-se que os doentes com asma intermitente apresentavam valores mais baixos quando comparados com os doentes com asma persistente grave ($48,8 \pm 27,1$ ppb vs $83,8 \pm 28,4$ ppb). Os doentes com asma persistente ligeira e persistente moderada apresentavam valores sobreponíveis ($65,3 \pm 28,1$ ppb e $62,7 \pm 27,4$ ppb, respectivamente) e intermédios relativamente aos anteriores.

Relativamente aos doentes não asmáticos, a distribuição dos valores de FE_{NO} nas diferentes patologias revelou resultados muito díspares (Quadro 5).

O Quadro 6 mostra os diferentes valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e exactidão diagnóstica (ED) para diferentes pontos de *cut-off* do FE_{NO}. O ponto de *cut-*

FE_{NO} VALUES

FE_{NO} values of the asthmatic and non-asthmatic patients are shown in Figure 4. The mean asthmatic patient FE_{NO} values were markedly higher than those of the non-asthmatic group; 60.5 ppb (32-89 ppb for a 95% confidence interval) vs. 21.4 ppb (5.4-37.4 ppb for a 95% confidence interval), with this difference being statistically significant ($p < 0.0005$) (Fig 5).

In analysing FE_{NO} values of the asthmatic patients in accordance with the severity of asthma (Table 4), it could be seen that the patients with intermittent asthma had lower values than the severe persistent asthma patients (48.8 ± 27.1 ppb vs. 83.8 ± 28.4 ppb). Patients with mild persistent and moderate persistent asthma presented similar (65.3 ± 28.1 ppb and 62.7 ± 27.4 ppb respectively) and intermediate values when compared to the former.

Distribution of FE_{NO} values in the non-asthmatic patients with different pathologies, showed very disparate results (Table 5).

Table 6 shows the different sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (A) values for the different FE_{NO} cut-off points. The 33 ppb FE_{NO} cut-off point was associated to a better sensitivity / specificity ratio, resulting in a greater accuracy in asthma diagnosis.

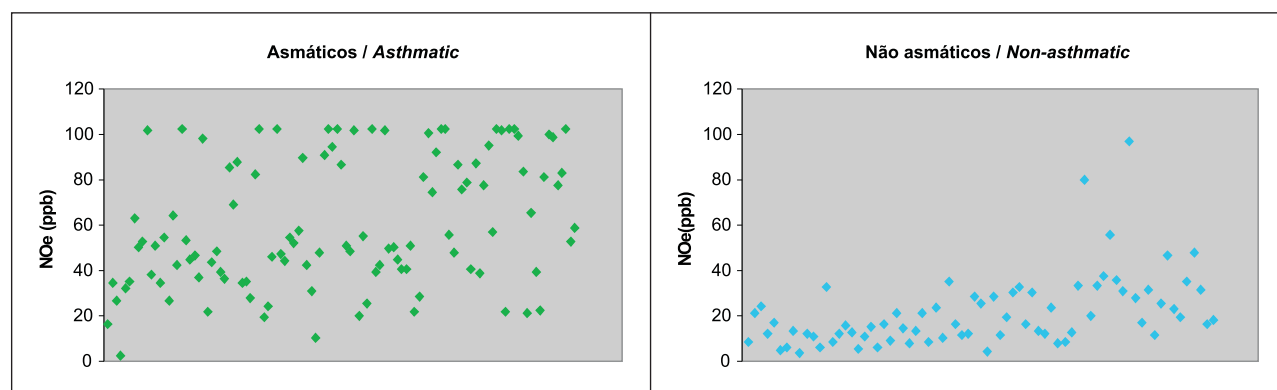


Figura 4. Valores de FE_{NO} obtidos nos doentes asmáticos e nos doentes não asmáticos
Figure 4. Asthmatic and non-asthmatic patients FE_{NO} values

Quadro 4. Valores de FE_{NO} para os diferentes graus de gravidade de asma (média \pm desvio padrão)

Gravidade da asma	FE_{NO} (ppb)
Intermitente	48,8 \pm 27,1
Persistente ligeira	65,3 \pm 28,1
Persistente moderada	62,7 \pm 27,4
Persistente grave	83,8 \pm 28,4

-off do FE_{NO} de 33 ppb esteve associado a uma melhor combinação entre especificidade e sensibilidade, resultando numa maior exactidão para o diagnóstico de asma.

DISCUSSÃO

Neste estudo demonstrámos que a concentração de NO no ar exalado de doentes com asma está aumentada relativamente aos doentes que não têm asma (Figuras 4 e 5). Este resultado está de acordo com os resultados publicados em trabalhos anteriores, que comparavam os valores de FE_{NO} em doentes asmáticos e não asmáticos^{16,17}. É ainda evidente, da análise dos dados, que existe algum grau de sobreposição nos valores de FE_{NO} nos doentes asmáticos e não asmáticos, facto que pode prejudicar a aplicação do FE_{NO} como método diagnóstico de asma. Ao interpretar os valores de FE_{NO} é necessário ter em consideração que a asma não é a única patologia que cursa com níveis elevados de óxido nítrico. Doentes com sintomas respiratórios sugestivos de obstrução das vias aéreas podem ter patologias muito diversas, algumas que não conduzem a um aumento dos valores de FE_{NO} , como a DPOC, a tosse psicogénica, a tosse provocada por IECA e a insuficiência cardíaca, mas outras que se acompanham de valores que podem ser até bastante elevados (rinite, sinusite, sarcoidose, infecções respiratórias) (Quadro 5)^{9,10}. Verificámos ainda que os valores do FE_{NO} nos doentes não asmáticos eram superiores aos da nossa população de referência de indivíduos normais (16 ppb). Isto é facilmente explicado

Table 4. FE_{NO} values for the different degrees of asthma severity (mean \pm standard deviation)

Severity of asthma	FE_{NO} (ppb)
Intermittent	48.8 \pm 27.1
Mild persistent	65.3 \pm 28.1
Moderate persistent	62.7 \pm 27.4
Severe persistent	83.8 \pm 28.4

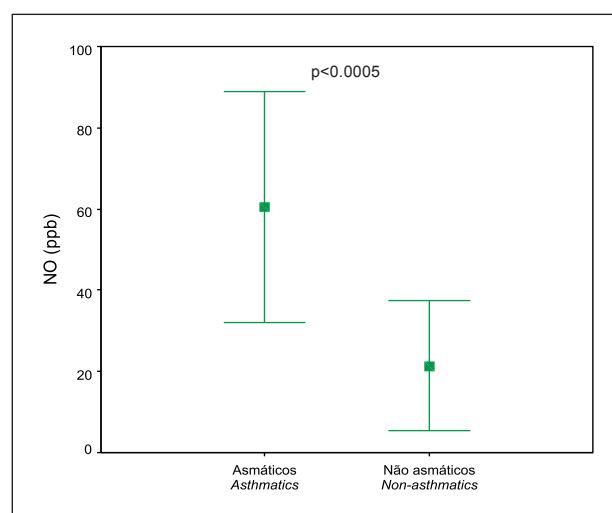


Figura 5. Comparação dos valores de FE_{NO} nos doentes asmáticos (média \pm desvio-padrão: 60,5 \pm 28,5 ppb) e nos doentes não asmáticos (média \pm desvio-padrão: 21,4 \pm 16,0 ppb) ($p < 0,0005$).
Figure 5. A comparison of FE_{NO} values in the asthmatic (mean \pm standard deviation: 60.5 \pm 28.5 ppb) and non-asthmatic patients (mean \pm standard deviation: 21.4 \pm 16.0 ppb) ($p < 0.0005$)

DISCUSSION

This study shows that there is a greater concentration of NO in the exhaled air of asthmatic patients than in that of non-asthmatic patients (Figs 4 and 5). This finding is in agreement with results published in earlier studies that compared asthmatic patients' FE_{NO} values with those of non-asthmatic patients^{16,17}. It is further apparent from data analysis that there is some degree of similarity in the FE_{NO} values of both asthmatic and non-asthmatic patients, a fact that could question the use of FE_{NO} as a tool for asthma diagnosis. When

Quadro 5. Valores de FE_{NO} para os diferentes diagnósticos nos doentes não asmáticos (os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão ou como resultados isolados)

Diagnóstico	N.º de Doentes	FE _{NO} (ppb)
Rinite	34	21,7 ± 19,4
DPOC	8	20,3 ± 11,2
Hiperreactividade das vias aéreas pós-infecciosa	7	14,3 ± 6,8
Sinusite	4	28,1 ± 20,3
Sarcoidose	3	32,8/23,8/10,8
Disfunção das cordas vocais	2	18,3/11,6
Insuficiência cardíaca	2	6,0/16,4
Silicose	2	4,2/35
Fibrose pulmonar	2	5,7/37,7
Traqueobronquite infecciosa	2	23,4/46,5
Tosse psicogénica	2	8,7/25,2
Tosse provocada por IECA	2	13,0/21,3
BOOP	1	28,6
Défice de alfa-1-antitripsina	1	30,7
Polipose nasal	1	36,3

Quadro 6. Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor preditivo positivo (VPP), Valor preditivo negativo (VPN) e Exactidão diagnóstica (ED) para diferentes pontos de cut-off do FE_{NO}

Valor de cut-off do FE _{NO} (ppb)	S	VPP	E	VPN	ED
16	98,2%	72,8%	45,2%	94,3%	76,9%
18	97,2%	75,7%	53,4%	92,8%	79,7%
20	95,4%	77,0%	57,5%	89,3%	80,2%
22	91,7%	78,7%	63,0%	83,6%	80,2%
24	90,8%	80,4%	67,1%	83,0%	81,3%
26	88,9%	82,2%	71,2%	81,2%	81,9%
28	86,2%	81,7%	71,2%	77,6%	80,2%
30	85,3%	83,8%	75,3%	77,5%	81,3%
31	84,4%	86,0%	79,4%	77,3%	82,4%
32	84,4%	87,6%	82,1%	77,9%	83,5%
33	83,4%	89,2%	84,9%	77,5%	84,1%
34	82,5%	90,0%	86,3%	76,8%	84,1%
35	80,7%	90,7%	87,6%	75,2%	83,5%
40	72,4%	94,0%	93,1%	69,4%	80,7%

Table 5. FE_{NO} values in the different diagnoses of non-asthmatic patients (values given as mean ± standard deviation or as isolated results)

Diagnosis	N.º of patients	FE _{NO} (ppb)
Rhinitis	34	21.7 ± 19.4
COPD	8	20.3 ± 11.2
Post-infection hyperresponsiveness of the airways	7	14.3 ± 6.8
Sinusitis	4	28.1 ± 20.3
Sarcoidosis	3	32.8/23.8/10.8
Vocal chord dysfunction	2	18.3/11.6
Cardiac failure	2	6.0/16.4
Silicosis	2	4.2/35
Pulmonary fibrosis	2	5.7/37.7
Infectious tracheobronchitis	2	23.4/46.5
Psychogenic cough	2	8.7/25.2
ACEI induced cough	2	13.0/21.3
BOOP	1	28.6
Alpha-1 antitrypsin deficiency	1	30.7
Nasal polyposis	1	36.3

Table 6. Sensitivity (S), Specificity (Sp), Positive predictive value (PPV) Negative predictive value (NPV) and Accuracy (A) for the different FE_{NO} cut-off points

Cut-off FE _{NO} value (ppb)	S	PPV	Sp	NPV	A
16	98.2%	72.8%	45.2%	94.3%	76.9%
18	97.2%	75.7%	53.4%	92.8%	79.7%
20	95.4%	77.0%	57.5%	89.3%	80.2%
22	91.7%	78.7%	63.0%	83.6%	80.2%
24	90.8%	80.4%	67.1%	83.0%	81.3%
26	88.9%	82.2%	71.2%	81.2%	81.9%
28	86.2%	81.7%	71.2%	77.6%	80.2%
30	85.3%	83.8%	75.3%	77.5%	81.3%
31	84.4%	86.0%	79.4%	77.3%	82.4%
32	84.4%	87.6%	82.1%	77.9%	83.5%
33	83.4%	89.2%	84.9%	77.5%	84.1%
34	82.5%	90.0%	86.3%	76.8%	84.1%
35	80.7%	90.7%	87.6%	75.2%	83.5%
40	72.4%	94.0%	93.1%	69.4%	80.7%

pela existência no grupo de doentes não asmáticos de patologias que cursam com valores de FE_{NO} acima do normal, tal como já foi referido.

Da análise dos valores de FE_{NO} , de acordo com os graus de gravidade de asma, verifica-se que, apesar de os doentes com graus mais ligeiros apresentarem valores mais baixos de FE_{NO} , existe ainda uma grande sobreposição entre os grupos (Quadro 4). De facto, apesar de o FE_{NO} reflectir a presença e a gravidade da inflamação das vias aéreas, os seus níveis não apresentam uma forte correlação com os sintomas ou com a função respiratória¹⁸.

O principal objectivo quando se determina um ponto de *cut-off* é atingir um balanço ideal entre os falsos positivos e os falsos negativos. Para valores de *cut-off* iguais aos da nossa população de indivíduos normais (16 ppb), a sensibilidade do FE_{NO} para o diagnóstico de asma é muito alta (98,2%), mas a especificidade é muito baixa (<50%). Um ponto de *cut-off* mais elevado permite aumentar a especificidade mas leva a uma diminuição da sensibilidade, sendo por isso maior o número de falsos negativos. O ponto de *cut-off* de 33 ppb associou-se à melhor combinação entre especificidade (84,9%) e sensibilidade (83,4%), resultando por isso em maior exactidão diagnóstica (84,1%) (Quadro 6).

Quando comparado com os outros métodos diagnósticos para a asma, o FE_{NO} atinge bons resultados. A avaliação da hipersensibilidade das vias aéreas a fármacos, como a histamina ou a metacolina, é o teste com maior exactidão diagnóstica, apresentando uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 100%¹⁹. A resposta a um broncodilatador inalado é menos exacta, apresentando valores de sensibilidade inferiores aos determinados para o FE_{NO} ¹⁹. Apesar de os valores de referência e os pontos de *cut-off* ainda não estarem bem estabelecidos a nível internacional, existe evidência suficiente para aprovar a aplicação do FE_{NO} na prática clínica diária. Apesar de vários estudos confirmarem a importância do FE_{NO} no diagnóstico de asma^{16,18,20,21}, o seu papel na prática clínica está mais bem estabelecido na monitorização da terapêutica^{18,22,23}.

interpreting FE_{NO} values, it must be borne in mind that asthma is not the only pathology to present with heightened nitric oxide levels. Patients with respiratory symptoms suggestive of airway obstruction could have very diverse pathologies, some of which do not lead to increased FE_{NO} levels. These pathologies include COPD, psychogenic cough, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) induced cough and cardiac failure. Other pathologies, (rhinitis, sinusitis, sarcoidosis and respiratory infections) however, do lead to raised FE_{NO} levels (Table 5)^{9,10}. It was further seen that the FE_{NO} values in the non-asthmatic patients were higher than those of our reference population of normal individuals (16 ppb). This is easily explained by the existence of pathologies in the non-asthmatic patient group which present with higher than normal FE_{NO} levels, as mentioned earlier.

In analysing FE_{NO} values in accordance with asthma severity, it was seen that while patients with less severe asthma had lower FE_{NO} values, there was a marked overlap between the groups (Table 4). Although FE_{NO} reflects the presence and severity of inflammation of the airways, there is not a strong correlation between FE_{NO} levels and symptoms or between FE_{NO} levels and lung function¹⁸.

The main aim in determining a cut-off point is to strike an ideal balance between the false positives and false negatives. For cut-off points similar to those of our population of normal individuals (16 ppb), FE_{NO} sensitivity for diagnosis is very high (98.2%) but the specificity is much reduced (<50%). A higher cut-off point allows the specificity to be raised but leads to a lowering in sensitivity, increasing the amount of false negatives. A 33 ppb cut-off point is associated to a better specificity (84.9%) / sensitivity (83.4%) ratio and as such leads to a greater diagnostic accuracy (84.1%) (Table 6).

FE_{NO} achieves satisfactory results in comparison with other asthma diagnosis methods. Assessing hypersensitivity of the airways to histamine or methacholine is the test with greater diagnostic accuracy. It has 85% sensitivity and 100% specificity¹⁹. The response to inhaled bronchodilator is less accurate and presents sensitivity values below those determined for FE_{NO} ¹⁹. While international

Um factor importante que pode limitar o uso do FE_{NO} na prática clínica é a grande quantidade de factores que o podem influenciar²⁴. No nosso estudo não incluímos doentes sob corticoterapia ou fumadores, mas está provado que ambos os factores diminuem os valores de FE_{NO} ^{24,25}. Existe também alguma evidência científica que sugere que os broncodilatadores de curta duração de acção podem conduzir a um aumento dos valores de FE_{NO} , que pode persistir até cerca de 1 hora²⁶. Já os agonistas β_2 de longa duração de acção não têm qualquer interferência no doseamento do FE_{NO} ²⁷. Os valores absolutos obtidos em cada medição dependem ainda do fluxo expiratório, por isso a standardização é fundamental^{14,28}. A contaminação do ar exalado das vias aéreas inferiores com o ar de proveniência nasal pode originar resultados falsamente elevados²⁹, o que pode ser reduzido fazendo o doente expirar contra uma resistência³⁰. As manobras de expiração forçada podem, por sua vez, causar uma diminuição nos valores de FE_{NO} que podem durar até 1h; por isso, se for necessário realizar uma espirometria, esta deve ser feita após o doseamento do FE_{NO} ³¹. Outro factor que pode limitar a aplicabilidade do FE_{NO} na prática clínica corrente é o preço do equipamento e a necessidade de ser realizado por técnicos com experiência.

Relativamente às limitações deste estudo, salienta-se o facto de se tratar de um estudo retrospectivo e, por esse motivo, poder haver algumas reservas quanto às conclusões que se podem tirar.

CONCLUSÕES

Neste estudo demonstrou-se que os valores de FE_{NO} nos doentes asmáticos (média= 60,5 ppb) são significativamente superiores aos dos não asmáticos (média=21,4 ppb) ($p<0,0005$). Para valores de *cut-off* de 33 ppb, o FE_{NO} tem boa sensibilidade (83,4%) e especificidade (84,9%) para o diagnóstico de asma em doentes com sintomatologia respiratória. Em doentes com

reference values and cut-off points have not yet been established, there is a sufficient body of evidence to back the use of FE_{NO} in daily clinical routine. Although several studies confirm the importance of FE_{NO} in diagnosing asthma^{16,18,20,21}, its role in clinical practice is better established in monitoring treatment^{18,22,23}.

One important factor that could limit the use of FE_{NO} in clinical practice is the wide variety of factors that could have an influence on it²⁴. We excluded from our study patients on corticosteroids or those who were smokers; it is proven that both these factors lower FE_{NO} values^{24,25}. There is also some scientific evidence which suggests that short acting bronchodilators can lead to an increase in FE_{NO} values which can last for around one hour²⁶, while long acting β_2 agonists do not impact in any way on FE_{NO} measurements²⁷. The absolute values obtained at each measurement depend in addition on the expiratory flow, making standardisation a must^{14,28}. The contamination of air exhaled through the lower airways by nasal air can give rise to falsely increased results²⁹, which can be reduced by having the patient exhale against resistance³⁰. Forced expiration manoeuvres can in their turn cause lowered FE_{NO} values which can last for approximately one hour, meaning that should spirometry be necessary, it should be carried out after FE_{NO} dosing³¹. A further factor that could limit the use of FE_{NO} in clinical practice is the cost of the equipment, which must be operated by experienced technicians.

In terms of limitations to this study, we highlight its retrospective design, which could impose some reservations on any conclusions which can be drawn from it.

CONCLUSIONS

This study shows that FE_{NO} values of asthmatic patients (mean values of 60.5 ppb) are significantly higher than those of non-asthmatic patients (mean values of 21.4 ppb) ($p<0.0005$). A FE_{NO} cut-off point of 33 ppb has good sensitivity (83.4%) and specificity (84.9%) in the diagnosis of asthma in patients with respiratory symptoms. FE_{NO} can

sintomas respiratórios sugestivos de asma, o FE_{NO} pode ser usado como um adicional método auxiliar no diagnóstico.

Os valores encontrados nos doentes não asmáticos (21,4 ppb) são superiores aos encontrados na população normal (<16 ppb), isto porque algumas patologias apresentadas pelos doentes não asmáticos cursam também com níveis elevados de FE_{NO} . Da análise dos resultados, salienta-se ainda que os valores de FE_{NO} não se correlacionaram com o grau de gravidade da asma.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração das técnicas cardiopneumologistas do Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar de Coimbra (Fátima Soares e Goretti Lopes) na colheita dos dados para o estudo.

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Teeter JG, Bleecker ER. Relationship between airway obstruction and respiratory symptoms in adult asthmatics. *Thorax* 1998; 113:272-7.
2. Sont JK, Han J, van Kieken JM, et al. Relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsy specimens and clinical severity of asthma treated with inhaled steroids. *Thorax* 1996; 51:496-502.
3. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing. 1999 *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:309-29.
4. Avital A, Godfrey S, Springer C. Exercise, methacholine and adenosine 5'.monophosphate challenges in children with asthma: relation to severity of disease. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30:207-14.
5. Bentley AM, Menz G, Storz C, et al. Identification of T-lymphocytes, macrophages and activated eosinophils in the bronchial mucosa of intrinsic asthma: relationship to symptoms and bronchial hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:500-6.
6. Al-Ali MK, Eames C, Howarth PH. Exhaled nitric oxide: relationship to clinico-physiological markers of asthma severity. *Respir Med* 1998; 92:908-13.
7. Lim S, Jatakanon A, Meah S, et al. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax* 2000; 55:184-8.
8. Van Rensen ELJ, Straathof KCM, Veselic-Charvat MA, et al. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils, and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. *Thorax* 1999; 54:403-8.
9. Maziak W, Loukides S, Culpitt S et al. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:998-1002.
10. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995; 8:295-7.
11. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, et al. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:609-12.
12. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1107-36.
13. American Thoracic Society Guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 161:309-29.
14. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:912-30.
15. Global initiative for asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention, 2002: NHLBI/WHO workshop report.

be used as one further auxiliary diagnostic tool in patients with respiratory symptoms suggestive of asthma.

The values found in non-asthmatic patients (21.4 ppb) were higher than those found in the normal population (<16 ppb), as some pathologies presented by the non-asthmatic patients also give rise to elevated FE_{NO} levels. From an analysis of the results, we would like to stress that FE_{NO} values did not correlate with the degree of severity of the asthma.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Centro Hospitalar de Coimbra Pulmonology Unit cardio-pulmonology technicians Fátima Soares and Goretti Lopes for their help in collecting data in this study.

16. Berkman N, Avital A, Breuer R, *et al.* Exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma: comparison with bronchial provocation tests. *Thorax* 2005; 60:383-388.
17. Chatkin JM, Ansarin K, Silkoff PE, *et al.* Exhaled nitric oxide as a non-invasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1810-3.
18. Smith AD, Taylor DR. Is exhaled nitric oxide measurement a useful clinical test in asthma? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:49-56.
19. Goldstein MF, Veza BA, Dunsky EH, *et al.* Comparisons of peak diurnal expiratory flow variation, postbronchodilator FEV1 responses, and methacholine inhalation challenges in the evaluation of suspected asthma. *Chest* 2001; 119:1001-10.
20. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003; 123:751-6.
21. 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.
22. Smith AD, Cowan OJ, Brassett KP, *et al.* Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med*, 2005; 352:2163-73.
23. Taylor DR. Nitric oxide as a clinical guide for asthma management. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:259-62.
24. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1693-722.
25. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:454-7.
26. Silkoff PE, Wakita S, Chatkin J, *et al.* Exhaled nitric oxide after beta2-agonist inhalation and spirometry in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:940-4.
27. Yates DH, Kharitonov SA, Barnes PJ. Effect of short and long-acting inhaled beta2-agonists on exhaled nitric oxide in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997; 10:1483-8.
28. Kharitonov SA, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10:1686-93.
29. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, *et al.* Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:260-7.
30. Kharitonov SA, Barnes PJ. Nasal contribution to exhaled nitric oxide during exhalation against resistance or during breath holding. *Thorax* 1997; 52:540-4.
31. Deykin A, Massaro AF, Coulston E, *et al.* Exhaled nitric oxide following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 161: 1237-40.