

# BRONKIAL PROVOKATION med inhaleret mannitol ved astma

## SAMMENDRAG:

For at bekræfte diagnosen astma, vil det ofte være nødvendig at påvise tilstedeværelse af bronkial hyperreaktivitet eller luftvejsinflammation. Bronkial hyperraktivitet kan påvises ved provokation med forskellige typer af stimuli og agens, enten ved hjælp af direkte tests så som indånding af fx metakolin eller ved indirekte tests så som anstrengelse, hyperventilation, hypertont saltvand og mannitol.

Provokation med inhaleret mannitol baseres på et osmotisk princip, hvor mannitol fører til en stigning i osmolaritet og dermed en dehydrering af cellerne i luftvejene, herunder inflammatoriske celler som eosinofile leukocytter og mastceller. Som respons på denne stress, frigiver cellerne bronkokontraherende mediatorer, fx prostaglandiner og leukotriener. Selve testen foregår efter samme princip som ved metakolinprovokation, idet patienten inhalerer stigende doser af mannitol i pulverform fra en inhalator, med efterfølgende kontrol af forceret eksspirationsvolumen i første sekund efter hver dosis. Testen består af engangsudstyr og kræver ud over dette kun et spirometer.

Hvor direkte tests er vist at have høj sensitivitet, men lav specificitet for astma, er det vist, at mannitoltestens specificitet for astma ligger på 98%, og sensitiviteten på 59%. Mannitoltesten kan derfor bruges til med stor sikkerhed at bekræfte tilstedeværelsen af astma såfremt testen er positiv. Studier har også peget på, at mannitoltesten har potentiale til at monitorere astma og fungere som mål for bedre sygdomskontrol.

ASGER SVERRILD, CELESTE PORSBJERG OG VIBEKE BACKER, Københavns Universitets hospital, Bispebjerg hospital

Astma er den hyppigste kroniske lidelse hos børn, unge og unge voksne (1). Mange astmatikere ved ikke, at de har astma, selvom de har lungesyntomer. Yderligere er en del af dem med astma kun delvis tilfredsstillende behandlet (2). En del af de udiagnosticerede patienter har luftvejsymptomer, som af patienterne opfattes som værende normale fund (2). Disse er hyppigt symptomer ved fysisk anstrengelse, og patienterne tror ofte, at de har dårlig kondition frem for astma. Disse patienter bør få stillet den rette diagnose, således at en relevant behandling kan sættes i værk, og fysisk aktivitet kan foregå uhindret. Astma kan behandles, og målet for behandlingen er en velkontrolleret sygdom (1). Med det forstås, at der hverken er dag- eller natlige symptomer fra lungerne, at patienten kan være fysisk aktiv og at lungefunktionen er normal (1). Det kan opnås hos patienter med astma ved relevant behandling, mens patienter uden astma ikke vil blive symptomfri på den samme behandling. Det er derfor væsentligt at udvikle metoder til påvisning af astma, som er lette at anskaffe og udføre samt kan erhverves til en rimelig pris.

Diagnosen astma kræver først og fremmest tilstedeværelsen af lungesyntomer i form af åndenød, trykken for brystet, hoste eller pibende og hvæsende vejrtrækning. Fra befolkningsundersøgelser vides det imidlertid, at langt fra alle med disse symptomer kan karakteriseres som havende astma (3, 4). Særlig velkendt er dette hos sportsfolk, hvor mange har symptomer fra lungerne uden at have astma (5). For at stille astmadiagnosen bruges, udover ovennævnte symptomer, også påvisningen af reversi-

bel luftvejsobstruktion. Til dette anbefales det fra Global Initiative For Asthma (GINA) at anvende reversibilitet af forceret eksspirationsvolumen i første sekund (FEV<sub>1</sub>) efter inhalation af beta<sub>2</sub>-agonist eller selvmonitorering af døgnvariation i peak expiratory flow (PEF).

Ovenstående vil ikke altid være tilstrækkeligt til at stille diagnosen astma, særligt ikke hos de patienter, som har normal lungefunktion på undersøgelsestidspunktet (FIGUR 1). Det anbefales i disse situationer, at få påvist tilstedeværelsen af andre abnorme bronkiale fund i form af bronkial hyperreaktivitet (BHR) eller luftvejsinflammation for at bekræfte diagnosen (6, 7). Såvel BHR som inflammation kan påvises med anvendelse af let tilgængelige målemetoder, som kan anvendes i praktisk klinisk arbejde. En af disse metoder til påvisning af BHR er mannitol, og i det følgende vil baggrunden for testen og dens anvendelsesmuligheder blive belyst.

## Direkte og indirekte provokationstests

Bronkial hyperreaktivitet er et abnorm respons med adskillige bagvedliggende mekanismer (8), som kan påvises ved provokation med forskellige typer af stimuli og agens. Overordnet klassificeres disse stimuli og agens i direkte og indirekte tests. De direkte tests består typisk i, at patienten indånder et stof, fx metakolin, som får den glatte muskulatur til at trække sig sammen. Processen er ved de direkte tests uafhængig af tilstedeværelsen af inflammatoriske celler, derimod har hyperreaktiviteten en tættere relation til kroniske forandringer i form af remodelering af luftvejene (8).

De indirekte tests så som anstrengelse, hyperventilation, hypertont saltvand og

## KONTAKTADRESSE:

Asger Sverrild, BMedSc  
Lungemedicinsk Forskningsenhed, afdeling L  
Bispebjerg Hospital  
DK - 2400 København NV  
asgersverrild@gmail.com

mannitol, fungerer via tilstedeværelsen af inflammatoriske celler i mucosa, som ved provokation udsender mediatorer, der igen får den glatte muskulatur til at trække sig sammen. De indirekte tests er således afhængige af, at der findes en cellulær inflammation i mucosa, og graden af hyperreaktivitet vil være afhængig af antallet af inflammatoriske celler.

### Virkningsmekanismen bag mannitol

Provokation med inhaleret mannitol baseres på et osmotisk princip, som opstod ud fra erfaringerne fra studier af anstrengelsesrelateret bronkokonstriktion (EIB): Det væsketab, der opstår ved indånding af store mængder tør luft ved anstrengelse, bevirker en stigning af osmolariteten i den periciliære væske i luftvejene. Denne stigning i osmolaritet medfører en dehydrering af cellerne i luftvejene, herunder inflammatoriske celler som eosinofile leukocytter og mastceller, der som respons frigiver bronkokontraherende mediatorer, fx prostaglandiner og leukotriener (9).

Man fandt, at astmatikere med EIB også reagerede overfor indånding af hypertont saltvand og dextrose, hvilket bekræftede teorien om en fælles, osmotisk virkningsmekanisme, og dannede baggrund for udviklingen af protokoller for bronkial provokation med NaCl (10, 11). Bronkial provokation med nebuliseret hypertont saltvand har nu været anvendt gennem lang tid (12–18), og erfa-



Mannitoltesten kan bruges til med stor sikkerhed at bekræfte tilstedeværelsen af astma såfremt testen er positiv. Selve testen består i at patienten inhalerer stigende doser af mannitol i pulverform fra en lille engangsinhalator, med kontrol af FEV1 efter hver dosis.

ringerne med denne testform førte til ønsket om at udvikle en ny osmotisk bronkial provokationstest i pulverform, som ville være mere praktisk anvendelig.

Oprindeligt testede man både NaCl og mannitol i pulverform, og fandt at begge dele var effektivt til at inducere bronkokonstriktion hos personer med astma (19, 20). Mannitol havde dog nogle fysiske egenskaber, som gjorde det mere velegnet til både opbevaring og inhalation (20, 21).

### Testen i praksis

Mannitoltesten er en dosis-respons test efter samme princip som ved en metakolinprovokation foretaget med dosimeter:

Patienten inhalerer stigende doser af mannitol i pulverform fra en lille engangsinhalator, med kontrol af FEV1 efter hver dosis. Testen består af i alt 19 kapsler med stigende mængder af mannitol, som i alt kumulerer til 635 mg fordelt over 8 doser. Definitionen på en positiv test er et fald i FEV1 på 15% i forhold til den første dosis, eller på 10% mellem to doser.

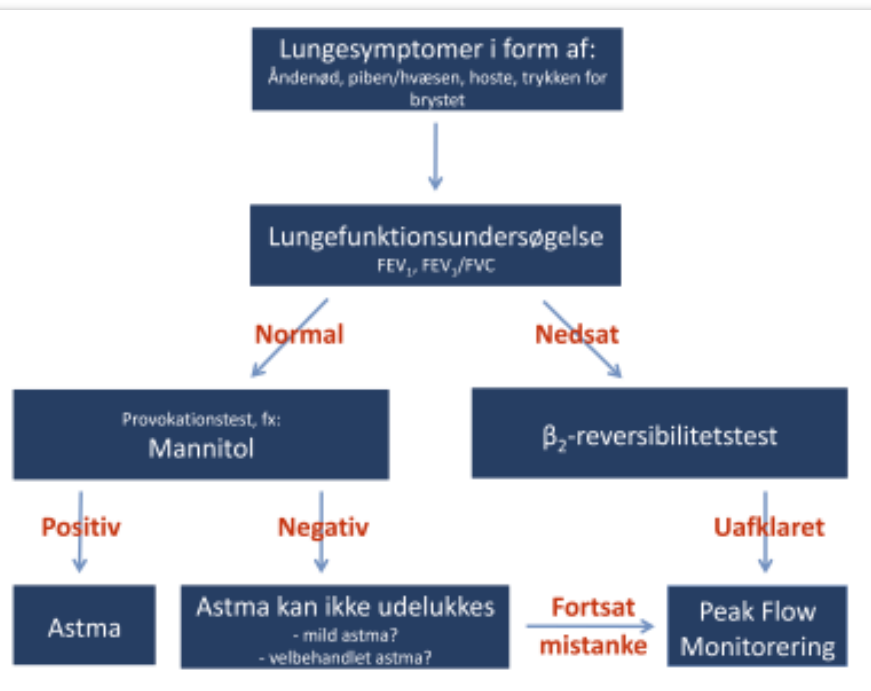
De første kliniske studier viste, at personer med astma og BHR overfor andre indirekte stimuli, så som NaCl og anstrengelse, også reagerede overfor bronkial provokation med mannitol (22, 23). Således var det muligt i selekterede populationer at vise en god sammenhæng mellem følsomheden overfor mannitol og både anstrengelse og cyklisk adenosinmonofosfat (AMP) (22, 23). Tilsvarende sammenhæng mellem responsen overfor mannitol og eukapnisk hyperventilation (EVH) er vist hos eliteatleter, hvorfor man har foreslået mannitol som en alternativ test til EVH (24). Grænsen for en positiv mannitoltest blev bestemt ud fra det observerede respons efter provokation af både raske og astmatikere (25).

### Mannitoltesten og inflammation af luftvejene

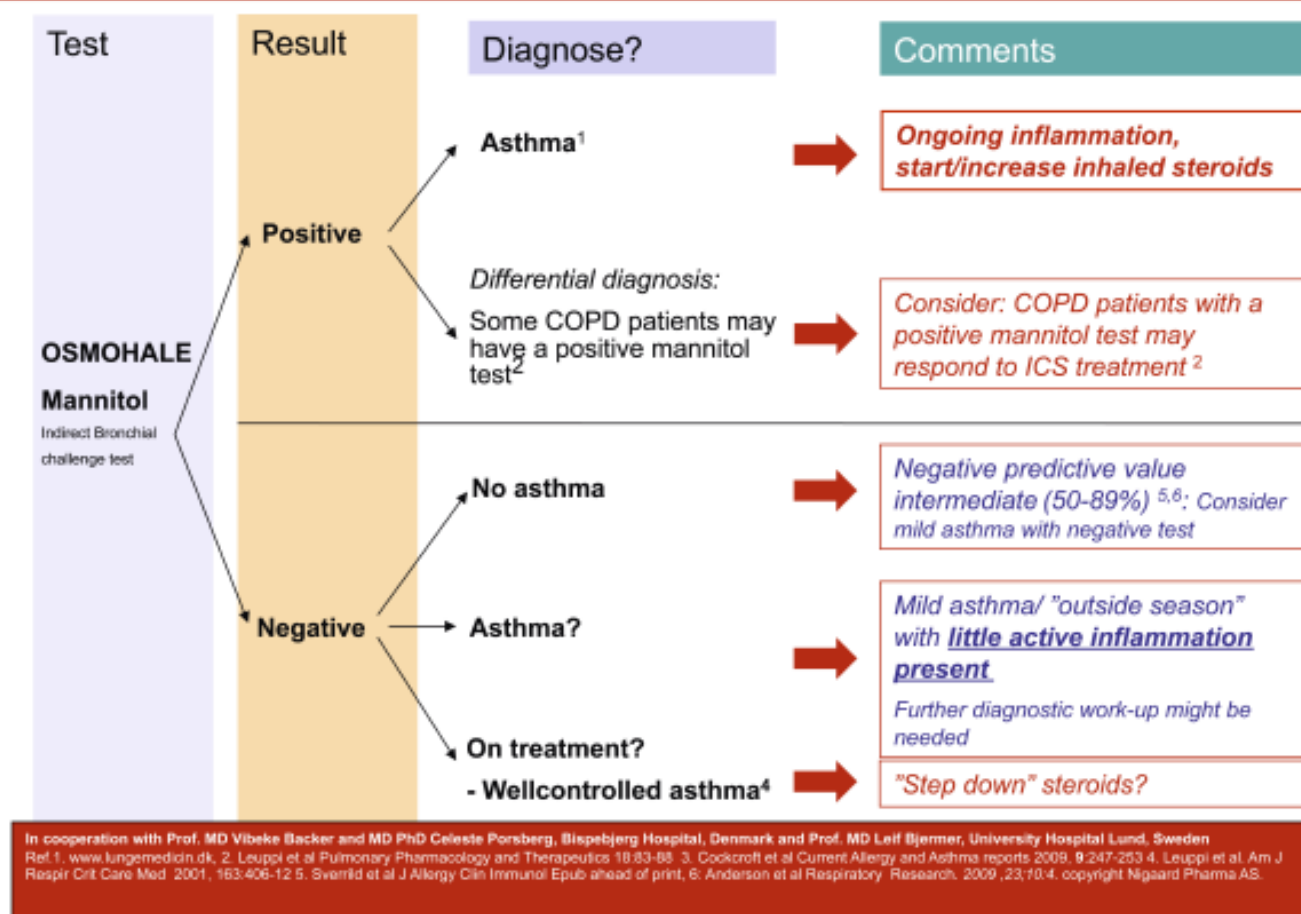
Princippet i de indirekte tests – herunder de osmotiske tests – er som anført en frigørelse af bronkokontraherende mediatorer fra inflammatoriske celler i luftvejene. BHR overfor disse tests er også vist at være tættere associeret til graden af luftvejsinflammation end de direkte (26).

Der er både in vitro og in vivo evidens for en sammenhæng mellem responsen

FIGUR 1. Flowchart for brug af mannitoltesten i astmadiagnostik.



# Interpreting guide



FIGUR 2. Fortolkningsguide for bronkial provokation med mannitol. VENNLIGST UDLÅNT AF NIGAARD PHARMA A/S.

overfor mannitol og pågående luftvejsinflammation. De første in vitro studier af mannitol viste således frigørelse af histamin, prostaglandiner og leukotriener fra humane basofile celler og mastceller efter stimulation med mannitol (27–29). Betydningen af mastcellen i responset overfor mannitol blev yderligere illustreret ved effekten af nedocromil, et mastcelle stabiliserende stof, der effektivt reducerede responset overfor mannitol (30). Tilsvarende reducerer fexofenadine, en H1 antagonist, også responset overfor mannitol (31). In vivo er dette påvist i form af en øget udskillelse af prostaglandin D<sub>2</sub> og leukotriene E<sub>4</sub> i urinen efter bronkial provokation med mannitol (32).

Et studie af steroid naive astmatikere udført på Bispebjerg Hospital i 2005 viste en sammenhæng mellem sensitiviteten overfor mannitol (PD<sub>15</sub>), sputum eosinofili og nitrogenoxid i udåndingsluften (eNO), der var stærkere end sammenhængen med sensitiviteten overfor metakolin (33). Et nyligt populationsstudie af en tilfældig stikprøve af teenagere og

unge voksne, har ligeledes vist en stærkere sammenhæng mellem eNO og mannitol end metakolin (34). Disse fund underbygger, at responset overfor en indirekte test som mannitol er relateret til en potentiel steroidfølsom pågående inflammation.

Sammenhængen med luftvejsinflammation understøttes også af studier af effekten af behandling med inhaleret steroid (ICS) på responset overfor mannitolprovokationstesten: 6 ugers behandling med ICS er vist at nedsætte den BHR overfor mannitol med en samtidig bedring i symptomscore (35, 36). Et positivt respons overfor mannitoltesten er omvendt vist at følge forværring af astma under nedtitrering af steroid dosis (37).

### Mannitoltesten og astmadiagnosen

Påvisning af BHR har været kendt for at sætte særlige krav til personale og udstyr i forbindelse med testning. De seneste år har der dog fundet en ensretning af testprotokollerne sted, og nye test, som mannitoltesten, er kommet på markedet.

Dette har øget BHR testenes tilgængelighed betydeligt og skærpet interessen omkring de diagnostiske egenskaber (38).

Da de direkte tests for alvor slog igennem i 1990'erne med sensitivitet op imod 100% (6), var det med håbet om, at disse tests udgjorde en nye guldstandard for astma. Det viste sig dog hurtigt, at de direkte test nok havde høj sensitivitet, men til gengæld også udviste lav specificitet for astma. Det er vist i flere studier, at ikke kun astmatikere udviser BHR på baggrund af fx metakolin og histamin. Patienter med KOL og rhinitis, men også asymptomatiske individer kan have BHR overfor methakolin (39). Eller sagt med andre ord; en person *med astma* vil med stor sikkerhed have en positiv test (høj sensitivitet), mens en person *uden astma* ligeledes i en række tilfælde vil kunne forventes at have en positiv test (lav specificitet).

Med introduktionen af de indirekte tests, herunder mannitoltesten, har astmadiagnostikken fået et redskab med be-

tydelig højere specificitet, end hvad er tilfældet med de direkte tests. De fleste studier er foretaget på selekterede grupper af astmapatienter, men et nyt studie foretaget på Bispebjerg Hospital, København, har undersøgt mannitoltestens diagnostiske egenskaber hos en uselekeret gruppe af unge voksne (3). Studiet viser, at testens specificitet for astma ligger på 98%, mens sensitiviteten er godt 59%. Dette er i overensstemmelse med fund fra andre indirekte tests som AMP og anstrengelsestest (40, 41). En person uden astma kan således forventes i 98% af tilfældene at have en negativ test, mens i gennemsnit 59% af patienterne med astma vil have en positiv test.

Styrken ved mannitoltesten i astma-diagnostikken ligger i den høje specificitet. Testen kan bruges til med stor sikkerhed at bekræfte tilstedeværelsen af astma såfremt testen er positiv. Falsk positive tests er beskrevet hos bl.a. rygere, hvor røgen menes at inducere et inflammatorisk respons med rekruttering af makrofager og mastceller (42). Derimod kan et negativt resultat ikke udelukke astma hos patienten (FIGUR 2). Falsk negative resultater kan bl.a. dække over milde former for astma, eller at patienten i forvejen er velbehandlet (35). Ved de direkte tests forholder det sig ganske omvendt, idet en negativ test med stor sikkerhed udelukker astma, mens et positivt respons ikke nødvendigvis er tegn på astma. De to grupper af test har således forskellig diagnostisk indikation, og skal bruges som sådan.

Studier har peget på, at mannitoltesten har potentiale til at monitorere astma og fungere som mål for bedre sygdomskontrol (43) Med baggrund i mannitoltestens virkemåde og relation til bronkial inflammation gennem aktivering af inflammatoriske mediatorer, er det nærliggende at antage, at testresultatet vil være påvirkeligt af antiinflammatorisk behandling. Brannan et al. viste i et studie fra 2002 at dette var tilfældet, idet alle forsøgsdeltagere oplevede et reduceret respons på mannitol efter behandling med inhalationssteroider (ICS), en undergruppe holdt sågar helt op med at reagere på mannitol (35).

Ændringer i lungefunktionen har ikke vist sig egnet som monitoreringsredskab for astmabehandling (37). Som tidligere påpeget falder reaktiviteten overfor mannitol derimod over en behandlingsperiode med ICS på måneder, og er afhængig af

den anvendte dosis og den givne tidsperiode for behandling. I forlængelse af dette, finder Leuppi et al., at øget følsomhed for mannitol under nedtitring af ICS hos astmapatienter er bedre indikator for manglende sygdomskontrol og exacerbation, end både symptomscore og måling af lungefunktion (37). Flere faktorer peger således i retning af, at mannitol kan bruges som surrogatparameter for graden af underliggende sygdom under ICS behandling, og at testen vil kunne vejlede reduktion af steroid til mindste effektive dosis. Yderligere studier er dog på nuværende tidspunkt nødvendigt for at bekræfte denne konklusion.

### Konklusion

Inhalation af mannitol er en ny test indenfor astmadiagnostikken. Den virker gennem en osmotisk påvirkning af tilstedeværende inflammatoriske celler i luftvejene, som fører til kontraktion af den glatte muskulatur. Testen består af et engangsudstyr, og kræver ikke andet end et spirometer.

Hvor de eksisterende direkte tests, som fx metakolin, har udvist særdeles høj sensitivitet, men manglet specificitet overfor astmadiagnosen, har mannitoltesten vist sig særdeles specifik i en uselekeret gruppe af unge. Testen bekræfter med meget stor sandsynlighed tilstedeværelsen af astma, i fald patientens test er positiv. Derimod er sensitiviteten lavere end de direkte tests, hvorfor testen skal ses som et supplement, og ikke en erstatning af fx metakolin.

Testens nære relation til pågående inflammation af luftvejene og sammenhængen mellem behandling med ICS og responset på mannitol har gjort, at testen er foreslået som potentielt monitoreringsredskab for astmabehandling. Viser dette sig tilfældet, vil det for mange patienter kunne betyde optimering af behandlingen, idet sygdomskontrol vil kunne kombineres med mindst mulige, effektive dosis ICS.

### Referencer

1. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31(1): 143–78.
2. Nolte H, Nepper-Christensen S, Backer V. Unawareness and undertreatment of asthma and allergic rhinitis in a general population. *Respir Med* 2006; 100(2): 354–62.

3. Sverrild A, Porsbjerg C, Thomsen SF, Backer V. Diagnostic properties of inhaled mannitol in the diagnosis of asthma: A population study. *J Allergy Clin Immunol* 2009.
4. Backer V, Nepper-Christensen S, Ulrik CS, von Linstow ML, Porsbjerg C. Factors associated with asthma in young Danish adults. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89(2): 148–54.
5. Lund TK, Pedersen L, Anderson SD, Sverrild A, Backer V. Are asthma-like symptoms in elite athletes associated with classical features of asthma? *Br J Sports Med* 2009.
6. Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA, Gore BP. Sensitivity and specificity of histamine PC20 determination in a random selection of young college students. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89(1 Pt 1): 23–30.
7. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(1): 309–29.
8. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(3): 551–9.
9. Anderson SD. Is there a unifying hypothesis for exercise-induced asthma? *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 660–5.
10. Schoeffel RE, Anderson SD, Altounyan RE. Bronchial hyperreactivity in response to inhalation of ultrasonically nebulised solutions of distilled water and saline. *Br Med J* 1981; 283: 1285–87.
11. Anderson SD, Schoeffel RE, Finney M. Evaluation of ultrasonically nebulised solutions as a provocation in patients with asthma. *Thorax* 1983; 38: 284–91.
12. Smith CM, Anderson SD. Inhalation provocation tests using non-isotonic aerosols. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 781–90.
13. Anderson SD, Smith CM, Rodwell LT et al. The use of non-isotonic aerosols for evaluating bronchial hyperresponsiveness. In: *Provocation Challenge Procedures*. Spector, S (Ed. (Marcel Dekker, New York, 1995): 249–78.
14. de Meer G, Marks GB, de Jongste JC, Brunekreef B. Airway responsiveness to hypertonic saline: dose-response slope or PD15? *Eur Respir J* 2005; 25(1): 153–8.
15. de Meer G, Postma DS, Janssen NA, de Jongste JC, Brunekreef B. Bronchial hyperresponsiveness to hypertonic saline and blood eosinophilic markers in 8–13 year old school children. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(8): 1226–31.
16. Riedler J, Gamper A, Eder W, Oberfeld G. Prevalence of bronchial hyperresponsiveness to 4.5% saline and its relation to asthma and allergy symptoms in Austrian

- children. *Eur Respir J* 1998; 11: 355–30.
17. Riedler J, Reade T, Dalton M, Holst DI, Robertson CF. Hypertonic saline challenge in an epidemiological survey of asthma in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1632–9.
  18. Rabone S, Phoon WO, Anderson SD *et al*. Hypertonic saline challenge in an adult epidemiological field survey. *Occup Med* 1996; 46: 177–85 ( ).
  19. Anderson SD, Spring J, Moore B *et al*. The effect of inhaling a dry powder of sodium chloride on the airways of asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1997; 10: 2465–73.
  20. Anderson SD, Brannan J, Spring J *et al*. A new method for bronchial-provocation testing in asthmatic subjects using a dry powder of mannitol. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 758–65.
  21. *Martindale: the complete drug reference* (Pharmaceutical Press, London, 1999).
  22. Brannan JD, Koskela H, Anderson SD, Chew N. Responsiveness to mannitol in asthmatic subjects with exercise- and hyperventilation-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(4): 1120–6.
  23. Munoz PA, Gomez FP, Manrique HA *et al*. Pulmonary gas exchange response to exercise- and mannitol-induced bronchoconstriction in mild asthma. *J Appl Physiol* 2008; 105(5): 1477–85.
  24. Holzer K, Anderson SD, Chan H-K, Douglass J. Mannitol as a challenge test to identify exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(4): 534–47.
  25. Brannan JD, Anderson SD, Perry CP *et al*. The safety and efficacy of inhaled dry powder mannitol as a bronchial provocation test for airway hyperresponsiveness: a phase 3 comparison study with hypertonic (4.5%) saline. *Respir Res* 2005; Dec 9; 6:144
  26. Van Den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HA, de Reus DM, Koeter GH, Kauffman HF, Postma DS. PC(20) adenosine 5'-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC(20) methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; Jun; 163(7): 1546–50.
  27. Findlay SR, Dvorak AM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Hyperosmolar triggering of histamine release from human basophils. *J Clin Invest* 1981; 67: 1604–13.
  28. Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Schleimer RP, Lichtenstein LM. Interaction between hyperosmolar and IgE-mediated histamine release from basophils and mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 86–91.
  29. Gulliksson M, Palmberg L, Nilsson G, Ahlstedt S, Kumlin M. Release of prostaglandin D2 and leukotriene C in response to hyperosmolar stimulation of mast cells. *Allergy* 2006; 61(12): 1473–9.
  30. Brannan JD, Anderson SD, Freed R *et al*. Nedocromil sodium inhibits responsiveness to inhaled mannitol in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 2096–9.
  31. Brannan JD, Anderson SD, Gomes K *et al*. Fexofenadine decreases sensitivity to and montelukast improves recovery from inhaled mannitol. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1420–5.
  32. Brannan JD, Gulliksson M, Anderson SD, Chew N, Kumlin M. Evidence of mast cell activation and leukotriene release after mannitol inhalation. *Eur Respir J* 2003; 22(3): 491–6.
  33. Porsbjerg C, Brannan JD, Anderson SD, Backer V. Relationship between airway responsiveness to mannitol and to methacholine and markers of airway inflammation, peak flow variability and quality of life in asthma patients. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(1): 43–50.
  34. Porsbjerg C, Sverrild A, Thomsen SF, Backer V. The association between AHR to mannitol and to methacholine and exhaled NO in a random sample population. ERS abstract. Unpublished.
  35. Brannan JD, Koskela H, Anderson SD, Chan H-K. Budesonide reduces sensitivity and reactivity to inhaled mannitol in asthmatic subjects. *Respirology* 2002; 7(1): 37–44.
  36. Koskela H, Hyvärinen L, Brannan JD, Chan H-K, Anderson SD. Sensitivity and validity of three bronchial provocation tests to demonstrate the effect of inhaled corticosteroids in asthma. *Chest* 2003; 124(4): 1341–9.
  37. Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR *et al*. Predictive markers of asthma exacerbations during stepwise dose-reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 406–2.
  38. Cockcroft DW, Davis BE. Diagnostic and therapeutic value of airway challenges in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009; 9(3): 247–53.
  39. Hewitt DJ. Interpretation of the «positive» methacholine challenge. *Am J Ind Med*. 2008 Oct; 51(10): 769–81, Kolnaar BGM, Folgering H, Hoogen HJM, van den, van Weel C. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in adolescents and young adults. *Eur Respir J* 1997; 10: 44–50.
  40. Fowler SJ, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. Relationship to asthma severity and beta(2)-receptor genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1318–22.
  41. Backer V, Ulrik CS. Bronchial responsiveness to exercise in a random sample of 494 children and adolescents from Copenhagen. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 741–7.
  42. Stolz D, Anderson SD, Gysin C, Miedinger D, Surber C, Tamm M, Leuppi JD. Airway reactivity to inhaled mannitol in cigarette smokers: A longitudinal study. *Respir Med* 2007 Jul; 101(7): 1470–6.
  43. Brannan JD, Koskela H, Anderson SD. Monitoring asthma therapy using indirect bronchial provocation tests. *Clin Respir J* 2007; 1: 3–15. ●