

# Oskrzelowy test prowokacyjny z metacholiną – aktualny stan wiedzy

## Bronchial methacholine challenge – the current state of knowledge

prof. dr hab. n. med. Zenon Siergiejo<sup>1,2</sup>, dr n. med. Grzegorz Siergiejo<sup>2,3</sup>, lek. Dominik Siergiejo<sup>2,4</sup>,  
lek. Piotr Siergiejo<sup>2,4</sup>, lek. Aleksander Krupa<sup>5</sup>, dr hab. n. med. Ewa Świebocka<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Samodzielna Pracownia Diagnostyki Układu Oddechowego i Bronchoskopii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>2</sup> Prywatny gabinet internistyczno-alergologiczny w Białymstoku

<sup>3</sup> Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>4</sup> Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>5</sup> GSK Commercial Sp. z o.o. w Warszawie

**Streszczenie:** Nieodłączną cechą astmy jest nadreaktywność oskrzeli. Oskrzelowy test prowokacyjny z metacholiną jest główną wystandaryzowaną metodą ilościowej oceny nadreaktywności oskrzeli. Przed 15 laty przyjęto, że dwie następujące metody podawania aerozolu metacholiny: metoda pięciu wdechów i dwuminutowa inhalacja ciągła, są równoważne. Autorzy tej pracy spróbowali podsumować dotychczasową wiedzę na temat oskrzelowego testu prowokacyjnego z metacholiną. Prace opublikowane po 2000 r. pokazują, że wyniki testów prowokacyjnych z metacholiną prowadzonych dwiema wyżej wspomnianymi metodami różnią się znamienne u osób z łagodną nadreaktywnością oskrzeli. Ponieważ na rynku pojawiają się nowe inhalatory i nebulizatory zalecane przez producentów do oskrzelowych testów prowokacyjnych, konieczne są dalsze badania nad standaryzacją procedury.

**Abstract:** The bronchial hyperreactivity is the inseparable feature of asthma. The methacholine challenge test is the main standardized method of the quantitative evaluation of bronchial hyperreactivity. Fifteen years ago it was accepted, that two aerosol delivery systems, i.e. five-breath dosimeter method and 2-min tidal breathing, are equivalent. The authors of this paper tried to sum up hitherto existing knowledge on the topic of the bronchial methacholine challenge. Works published after the year 2000 show that results of methacholine challenge led two mentioned higher methods differ at persons with mild BHR significantly. Because new inhalers and nebulizers recommended by manufacturers to bronchial provocative tests appear on the market, more far investigations over standardization of the procedure are necessary.

**Słowa kluczowe:** astma, metacholina, nadreaktywność oskrzeli, oskrzelowy test prowokacyjny

**Key words:** asthma, methacholine, bronchial hyperreactivity, bronchial challenge test

**O** bencnie (koniec 2014 r.) oskrzelowy test prowokacyjny (OTP) z metacholiną, jako jeden z dwóch, od 15 lat uznaje się za standardową metodę oceny reaktywności oskrzeli. Protokoły do jego przeprowadzania metodami inhalacji ciągłej i pięciu wdechów zatwierdziło jako

równoważne American Thoracic Society (ATS) w 1999 r. [1]. Opisują one również dokładnie procedury i interpretację testu. Po wpisaniu hasła „methacholine challenge” do wyszukiwarki bazy PubMed 5 września 2014 r. wyświetliły się 3124 pozycje, co świadczy o szerokim badaniu proble-

mu i wskazuje na przydatność podsumowania zawartej tam wiedzy. A teraz wróćmy do pierwszego zdania tego akapitu: użyto w nim kilku pojęć, których definicje warto przypomnieć.

**Oskrzelowy test prowokacyjny** jest specjalną procedurą diagnostyczną służącą do wykazywania lub wykluczania nadreaktywności oskrzeli (BHR, *bronchial hyperreactivity*) u ludzi. Dotychczas opracowano szereg różnych OTP.

Drogi oddechowe są zbudowane ze struktur, które mogą zmieniać swoją objętość (skurcz mięśni gładkich, obrzęk błony śluzowej oraz wydzielina gruczołów śluzowych), a przez to zmniejszać ich drożność (obturacyja). W zdrowych drogach oddechowych regulacja taka odbywa się pod wpływem różnych bodźców, np. wdychania substancji drażniących, zimnego powietrza, i można tę cechę nazwać **reaktywnością oskrzeli**.

Nadmierną wrażliwość oskrzeli na różne bodźce prowadzącą do upośledzenia ich drożności i towarzyszącą niektórym chorobom (nie tylko układu oddechowego) można nazwać **nadreaktywnością**. BHR jest cechą niepożądaną, charakteryzującą się nadmierną reakcją skurczową oskrzeli w odpowiedzi na małe natężenie różnych bodźców prowokujących, spośród których należy wymienić m.in.: metacholinę, acetylocholinę, histaminę, wodę destylowaną, hipertoniczny roztwór chlorku sodowego, mannitol, wysiłek fizyczny i zimne powietrze [2, 3].

Metacholina (Mecholyl, Provocholine®) jest syntetycznym estrem choliny ( $\beta$ -metylowanym homologiem acetylocholiną). Różni się od niej dłuższym czasem działania i selektywnością w stosunku do receptorów na mięśniach gładkich [4, 5].

Od ukazania się standardów przeprowadzania OTP upłynęło już trochę czasu i opublikowano szereg nowych faktów zmieniających nasze spojrzenie na klasyczny OTP z metacholiną. Przedstawienie dotychczasowej wiedzy na ten temat jest celem niniejszego artykułu.

### Badania od lat czterdziestych ubiegłego wieku do 1999 r.

W latach czterdziestych ubiegłego wieku John Curry z Uniwersytetu w Bostonie badał efekty parenteralnego podawania mecholyly (odpowiednik metacholiny) ludziom zdrowym oraz chorym na pyłkowicę i astmę. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdził, że mecholyl wywołuje m.in. skurcz oskrzeli, a efekt jest zależny od zaaplikowanej dawki [6, 7]. Wcześniej w podobnym układzie oceniał działanie histaminy. Porównywał efekty oddziaływania chlorku mecholyly podawanego osobno i razem z histaminą różnymi drogami: domięśniową, dożylną i inhalacyjną. Oceniał również ich działanie na układy: krążenia, pokarmowy i oddechowy [6, 7]. Wpływ na układ oddechowy mierzył spirometrycz-

nie, oceniając pojemność życiową – VC (w tamtym okresie objętość wydechowa pierwszosekundowa –  $FEV_1$  – nie była jeszcze powszechnie stosowanym parametrem). John Curry stwierdził, że układ oddechowy chorych na astmę i pyłkowicę znacznie silniej niż u osób zdrowych reaguje na mecholyl, a podanie inhalacyjne wywołuje większą odpowiedź skurczową oskrzeli niż aplikacja domięśniowa lub dożylna. Działanie rozpoczyna się już po 30 s, a całkowicie ustępuje po 15 min. Curry zauważył też, że odpowiedź oskrzeli na mecholyl u chorych na astmę była podobna do tej obserwowanej po histaminie [6, 8, 9]. Doświadczenia Curry'ego były pionierskimi pracami dotyczącymi efektu histaminy i mecholyly in vivo u ludzi. Nie można ich jeszcze nazwać oskrzelowymi testami prowokacyjnymi, ale później zostały one w znacznym stopniu wykorzystane do procedur prowokacyjnych.

Pierwsze próby z zastosowaniem metacholiny do ilościowej oceny reaktywności oskrzeli pochodzą z lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia [10]. To dziesięciolecie charakteryzowało się ogromnym zainteresowaniem próbami prowokacyjnymi z alergenem, ale w naszym kraju Droszcz i wsp. używali do testów acetylocholinę [11, 12].

W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX w. ukazało się mnóstwo prac pochodzących z ośrodków amerykańskich, europejskich i australijskich na temat zastosowania OTP z metacholiną, a także pojawiły się pierwsze próby standaryzacji metody [5, 13–17]. Spector i Farr opublikowali badanie porównujące test prowokacyjny z histaminą i metacholiną i wykazali, że generalnie oba testy dają porównywalne wyniki. Jedynie chorzy na cięższą postać astmy alergicznej silniej reagują na histaminę niż na metacholinę [13]. W Kanadzie co najmniej dwa ośrodki prowadziły zaawansowane badania nad reaktywnością oskrzeli. Ośrodek z Hamilton preferował metacholinę, a z Saskatoon – histaminę [18–20]. Na początku lat osiemdziesiątych badacze kanadyjscy z wyżej wspomnianych ośrodków opublikowali wyniki badań nad standaryzacją inhalacyjnych testów prowokacyjnych, rozważwszy wpływ na końcowy efekt następujących czynników: różnych substancji prowokujących, metod inhalacji, średnicy inhalowanych cząstek oraz wydajności nebulizatorów [21–23]. Jeden z autorów tego artykułu rozpoczął w tym czasie wykonywanie OTP z metacholiną według dozymetrycznego protokołu pięciu wdechów, używając takich samych stężeń środka prowokującego, jakie zalecano do metody inhalacji ciągłej [18, 24, 25].

W latach dziewięćdziesiątych protokół pięciu wdechów został skrócony poprzez zmniejszenie liczby stężeń histaminy lub metacholiny używanych do OPT [25]. Własne przewodniki do OPT przygotowały: Amerykańska Akademia Alergologii i Immunologii, European Respiratory Society i szwedzki koncern farmaceutyczny Astra Draco AB [26–28].

Ukoronowaniem prac nad ujednoczeniem metod i interpretacji wyników OTP było opracowanie przez ATS

w 1999 r. wytycznych dotyczących przeprowadzania prowokacji oskrzelowych [1]. Stwierdzono, że metody inhalacji ciągłej [18] i pięciu wdechów (1981) są porównywalne, a ich wyniki – równoważne. Za referencyjną substancję do prowokacji nieswoistych uznano metacholinę. Pozycja ta stała się „katechizmem” badaczy reaktywności oskrzeli, na niej także opierała się Światowa Inicjatywa Zwalczania Astmy (GINA) [29]. W opracowaniu tym można znaleźć wskazówki dotyczące wskazań, przeciwwskazań, danych na temat bezpieczeństwa testu, przygotowania osób wykonujących testy, przygotowania pacjenta, protokoły inhalacji ciągłej i pięciu wdechów, nebulizatorów i dozymetru, spirometrii, prezentacji wyników i ich interpretacji [1].

### Badania po 2000 r.

Test prowokacyjny z metacholiną stał się wzorcowym, klasycznym narzędziem badania reaktywności oskrzeli. Prace nad nim trwają jednak nadal, a nowe obserwacje są sukcesywnie publikowane. Badania z nowymi substancjami prowokującymi są porównywane właśnie z tym testem. W ostatnich latach lansowany jest nowy test z mannitolem [30, 31]. Własne doświadczenia z oskrzelowym testem prowokacyjnym z mannitolem zdobyli także autorzy tego artykułu [32].

Dalsze badania nad testem z metacholiną przyniosły szereg nowych spostrzeżeń. Na przełomie wieków XX i XXI opublikowano prace pokazujące, że głębokie wdechy, aż do poziomu TLC, wykonane po inhalacji metacholiną zapobiegają skurczowi oskrzeli. Efekt jest większy u ludzi zdrowych niż u astmatyków [33–35]. Impulsem do tych badań były prace Fisha i wsp. z początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku wykazujące bronchodylatoryjny efekt głębokich wdechów [33]. Cockroft i Davis w 2006 r. opublikowali pracę wykazującą, że również pięć głębokich wdechów podczas dozymetrycznego podawania metacholiny wywiera wpływ ochronny na odpowiedź oskrzeli u chorych z ich łagodną nadreaktywnością [36, 37]. W 2008 r. Prieto i wsp. porównali także metodę dozymetryczną i inhalacji ciągłej podczas testu z metacholiną i wykazali, że ta druga metoda daje wartości  $PC_{20}$  znacznie niższe niż metoda dozymetryczna pięciu wdechów [38]. Wyniki tych badań pokazują, że dwie powyższe metody prowokacji: inhalacji ciągłej i pięciu wdechów, zalecane przez ATS do oceny reaktywności, nie mogą być całkiem bezkrytycznie traktowane jako równoznaczne. Pojawił się problem wyników fałszywie ujemnych po prowokacji dozymetrycznej u osób z łagodną BHR. Autorzy sugerują, że metoda pięciu wdechów nie powinna być wykonywana podczas testu z metacholiną, jak to opisano w zaleceniach ATS. Najnowsze protokoły prowokacji metodą pięciu wdechów zalecają spokojne wdychanie metacholiny (*tidal volume*) [39].

W 2006 r. opublikowano pracę porównującą dwie metody prowokacji ciągłej w teście z metacholiną, opisane wcześniej w 1984 r. przez Juniper i wsp. dla testu z histaminą, a mianowicie z użyciem maski oraz ustnika z zastawką i filtrem [40]. Obie metody okazały się równoważne [41].

Wyniki badań Parker i wsp. opublikowane w 2004 r. pokazują, że osoby z wyższą reaktywnością oskrzeli na metacholinę demonstrują silniejszą odpowiedź rozkurczową po inhalacji zarówno leków  $\beta_2$ -adrenergicznych, jak i kombinacji: lek  $\beta$ -adrenergiczny + antycholinergiczny [42].

Wytyczne ATS z 1999 r. porównują tylko dwa systemy nebulizacyjne używane w oskrzelowych testach prowokacyjnych, a mianowicie: w metodzie dwuminutowej inhalacji ciągłej zalecają nebulizator Wrighta, a w metodzie pięciu wdechów – nebulizator DeVilbiss 646. Do niedawna nie było wyników badań *in vitro* oceniających, czy oba systemy w trakcie testów dostarczają podobnej ilości metacholiny; wcześniejsze prace dotyczyły raczej histaminy i sugerowały równoważność obu protokołów. Badania z ostatnich lat nie do końca potwierdzają te założenia, a na rynku pojawiły się nowe systemy przeznaczone do prowokacji oskrzelowych. Coates i wsp. w 2014 r. porównali *in vitro* wydajność nowych nebulizatorów z wydajnością starych. Wdechy były generowane za pomocą pomp kalibracyjnych, a ilość wdychanego aerozolu metacholiny oznaczano po wypłukaniu jej z filtrów. W teście inhalacji ciągłej badacze porównywali inhalator AeroEclipse II BAN z inhalatorem VIASYS i nebulizatorem Wrighta, natomiast podczas metody pięciu wdechów – inhalator AeroEclipse z nebulizatorem DeVilbiss 646. Najmniejsze różnice w ilości „inhalowanej” metacholiny stwierdzano między metodami klasycznymi, zalecanymi przez ATS, natomiast nowe systemy pozostawiają na filtrze znacznie więcej metacholiny, a to oznacza, że trzeba opracować nowe protokoły dla każdego systemu prowokacyjnego, aby do układu oddechowego docierały ekwiwalentne dawki metacholiny [43].

W naszej pracowni stosujemy dozymetryczną metodę pięciu wdechów według Rosenthala z użyciem nebulizatorów DeVilbiss 646. Do inhalacji używamy następujących stężeń metacholiny: 0,025 mg/ml, 0,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 10 mg/ml i 25 mg/ml. Wynik prowokacji traktujemy jako ujemny, jeżeli najwyższe z użytych stężeń nie powoduje obniżenia wartości  $FEV_1$  przynajmniej o 20% w porównaniu z wartością uzyskaną po inhalacji fizjologicznego roztworu chlorku sodowego. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego stopień nadreaktywności oskrzeli wyrażany jest wartością  $PC_{20}FEV_1$  w mg/ml metacholiny (stężenie metacholiny powodujące obniżenie  $FEV_1$  dokładnie o 20% w stosunku do wartości uzyskanej po inhalacji 0,9% NaCl). Choć wartość  $PC_{20}FEV_1$  w granicach 16–25 mg/ml świadczy o dodatnim wyniku OTP, interpretujemy ją jako prawidłową reaktywność oskrzeli. Natomiast wartości  $PC_{20}FEV_1 < 16$  mg/ml

traktujemy jako nadreaktywność oskrzeli. Dokładny podział na stopnie ciężkości przedstawiono w tabeli 1. Jeszcze do niedawna rozróżnialiśmy umiarkowaną i ciężką BHR, co pokazują przykładowe wyniki testów zawarte na rycinach. Przedstawiają one dwa dodatnie wyniki testu prowokacyjnego z metacholiną: jeden z graniczną BHR, a drugi z łagodną.

**Tabela 1.** Interpretacja wskaźnika  $PC_{20}FEV_1$  dla metacholiny [1, 45].

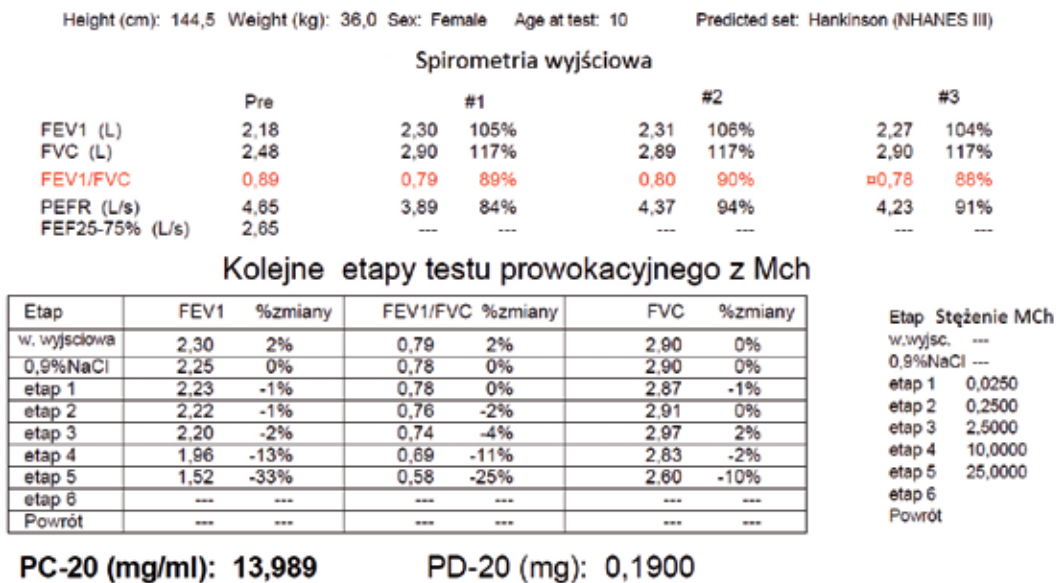
PC20FEV1 (mg/ml)	Interpretacja
> 16	prawidłowa reaktywność oskrzeli
4–16	graniczna nadreaktywność oskrzeli
1–4	łagodna nadreaktywność oskrzeli
0,25–1	umiarkowana i ciężka nadreaktywność oskrzeli

**Rycina 1.** Wynik OTP z metacholiną u 10-letniej dziewczynki diagnozowanej w kierunku astmy, wykazujący śladową nadreaktywność oskrzeli ( $PC_{20}FEV_1 = 13,989$  mg/ml).

Rycina 1 przedstawia dodatni wynik OTP z metacholiną u 10-letniej dziewczynki. Wyjściowe badanie spirometryczne było prawidłowe, chociaż w jednej z trzech przedstawionych prób wartość  $FEV_1/FVC$ , wynosząca 0,78, była nieco poniżej dolnej granicy normy, natomiast pozostałe wartości: odpowiednio 0,79 i 0,8, mieściły się już w normie. Uzyskana wartość  $PC_{20}FEV_1$ , wynosząca 13,989 mg/ml metacholiny, pozwala rozpoznać graniczną BHR oskrzeli, ale zgodnie ze stanowiskiem ATS wartość > 8 mg/ml jest zazwyczaj dla astmy niecharakterystyczna.

Na rycinie 2 widnieje wynik OTP 9-letniego chłopca z prawidłową spirometrią wyjściową. Wartość  $PC_{20}FEV_1$  równa 1,371 mg/ml metacholiny pozwala rozpoznać łagodną BHR. Jeżeli wywiad sugeruje diagnozę astmy, to taki wynik ją popiera.

### Oskrzelowy test prowokacyjny z Metacholiną



**Interpretacja wyniku na podstawie  $PC_{20}FEV_1$ :**

- Ujemny wynik testu prowokacyjnego - po 25mg/ml % zmiany  $FEV_1 < 20$
- 16mg/ml <  $PC_{20} < 25$ mg/l - wynik dodatni - ale prawidłowa reaktywność
- 4mg/ml <  $PC_{20} < 16$ mg/ml - śladowa nadreaktywność oskrzeli
- 1mg/ml <  $PC_{20} < 4$ mg/ml - łagodna nadreaktywność oskrzeli
- 0,25mg/ml <  $PC_{20} < 1$ mg/ml - umiarkowana nadreaktywność oskrzeli
- $PC_{20} < 0,25$ mg/ml - ciężka nadreaktywność oskrzeli

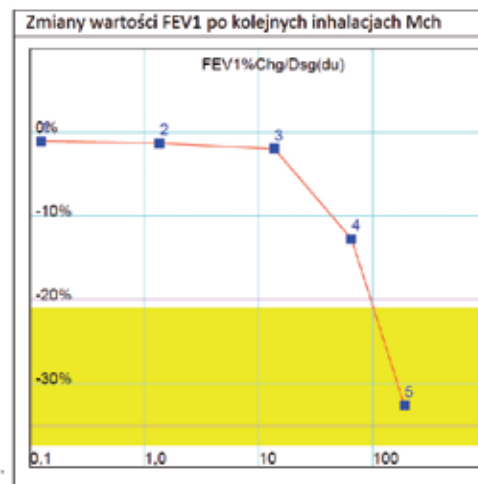
**Wniosek:**

*Wynik testu prowokacyjnego z metacholina dodatni. Śladowa nadreaktywność oskrzeli.*

Zenon Siergiejko

.....  
wykonał

.....  
Interpretacja



Rycina 2. Wynik OTP z metacholiną u 9-letniego chłopca diagnozowanego w kierunku astmy oskrzelowej, wykazujący łagodną BHR ( $PC_{20}FEV_1 = 1,371$  mg/ml).

## Oskrzelowy test prowokacyjny z Metacholiną

Height (cm): 141,2 Weight (kg): 40,0 Sex: Male Age at test: 9 Predicted set: Hankinson (NHANES III)

### Spirometria wyjściowa

	Pre	#1	#2	#3
FEV1 (L)	2,06	1,85 90%	1,87 91%	1,67 81%
FVC (L)	2,44	2,39 98%	2,31 95%	2,12 87%
FEV1/FVC	0,86	0,77 90%	0,81 94%	0,79 91%
PEFR (L/s)	4,33	4,69 108%	4,71 109%	3,75 87%
FEF25-75% (L/s)	2,23	---	---	---

### Kolejne etapy testu prowokacyjnego z Mch

Etap	FEV1	%zmiany	FEV1/FVC	%zmiany	FVC	%zmiany	Etap	Stężenie MCh
w. wyjściowa	1,85	0%	0,77	0%	2,39	0%	w.wyjsc.	---
0,9%NaCl	1,86	0%	0,77	0%	2,41	1%	0,9%NaCl	---
etap 1	1,72	-7%	0,75	-4%	2,30	-4%	etap 1	0,0250
etap 2	1,88	-9%	0,69	-10%	2,42	1%	etap 2	0,2500
etap 3	1,41	-24%	0,63	-19%	2,25	-6%	etap 3	2,5000
etap 4	---	---	---	---	---	---	etap 4	---
etap 5	---	---	---	---	---	---	etap 5	---
etap 6	---	---	---	---	---	---	etap 6	---
Powrót	---	---	---	---	---	---	Powrót	---

PC-20 (mg/ml): 1,371

PD-20 (mg): 0,0152

#### Interpretacja wyniku na podstawie PC20FEV1:

- Ujemny wynik testu prowokacyjnego - po 25mg/ml % zmiany FEV1 < 20
- 16mg/ml < PC20 < 25mg/ml - wynik dodatni - ale prawidłowa reaktywność
- 4mg/ml < PC20 < 16mg/ml - śladowa nadreaktywność oskrzeli
- 1mg/ml < PC20 < 4mg/ml - łagodna nadreaktywność oskrzeli
- 0,25mg/ml < PC20 < 1mg/ml - umiarkowana nadreaktywność oskrzeli
- PC20 < 0,25mg/ml - ciężka nadreaktywność oskrzeli

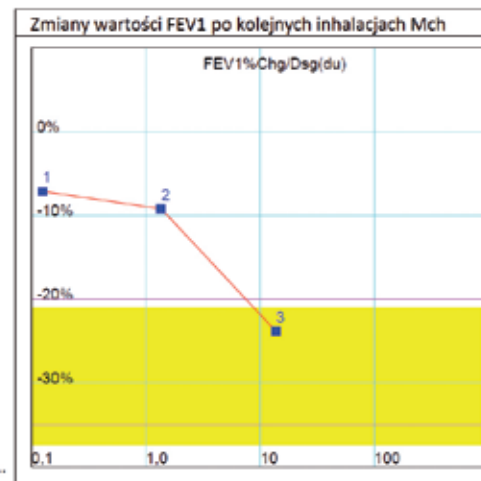
#### Wniosek:

Wynik testu prowokacyjnego z metacholiną dodatni. Nadreaktywność oskrzeli łagodna. Prawdopodobnie astma.

Zenon Siergiejko

wykonał

interpretacja



### Podsumowanie

W podsumowaniu chcemy zaznaczyć, że pojedynczy ujemny wynik OTP z metacholiną nie pozwala wykluczyć rozpoznania astmy, podobnie jak pojedynczy dodatni wynik nie jest równoznaczny z rozpoznaniem tej choroby [44]. Warto przypomnieć krzywe prawdopodobieństwa astmy przed testem prowokacyjnym z metacholiną i po nim, według których wynik  $PC_{20}FEV_1 \leq 1$  mg/ml metacholiny zniżyło prawdopodobieństwo rozpoznania astmy u osób z prawidłowymi wartościami  $FEV_1$ .

Dobrym przewodnikiem przy prowadzeniu testu prowokacyjnego z metacholiną jest dostępny w Internecie program szkoleniowy producenta zestawów do prowokacji z 2010 r. [45].

Do przeprowadzania OTP z metacholiną należy używać nebulizatorów zalecanych przez ATS. Nowe nebuli-

zatory i urządzenia prowokujące wymagają jeszcze dalszych badań.

### Piśmiennictwo:

1. American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing – 1999. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, 161: 309-329.
2. Sterk P.J., Bel E.H.: Bronchial hyperresponsiveness: The need a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. *Eur. Respir. J.* 1989, 2: 267-274.
3. Siergiejko Z.: Farmakologiczna modulacja reaktywności oskrzeli. Rozprawa habilitacyjna, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok 1997.
4. Ulotka handlowa Provocholin®<sup>®</sup>, Methapharm Inc.

5. Townley R.G., Ryo U.Y., Kolotkin B.M. et al.: Bronchial sensitivity to methacholine in current and former asthmatic and allergic rhinitis patients and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1975, 56: 429-442.
6. Curry J.J.: Comparative action of acetyl-beta-methyl choline and histamine on the respiratory tract in normals, patients with hay fever, and subjects with bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 1947, 26(3): 430-438.
7. Curry J.J.: The action of histamine on the respiratory tract in normal and asthmatic subjects. *J. Clin. Invest.* 1946, 25: 785.
8. Tiffenau R., Pinelli A.: Air circulant et air captif dans l'exploration de la fonction ventilatrice pulmonaire. *Paris Med.* 1947, 37: 624-628.
9. Yernault J.C.: The birth and development of the forced expiratory manoeuvre: a tribute to Robert Tiffenau (1910-1961). *Eur. Respir. J.* 1997, 10: 2704-2710.
10. Felarcar A.B., Itkin I.H.: Studies with the quantitative-inhalation challenge technique. I. Curve of dose response to acetyl-beta-methylcholine in patients with asthma of known and unknown origin, hay fever subjects, and nonatopic volunteers. *J. Allergy* 1966, 37(4): 223-235.
11. Droszcz W., Ajewski Z.: The value of bronchodilatory test and acetylcholine provocation test in the diagnosis of bronchospastic conditions. *Gruźlica* 1965, 33: 287-293.
12. Aas K.: Bronchial provocation tests in asthma. *Arch. Dis. Child.* 1970, 45: 221-228.
13. Spector S.L., Farr R.S.: A comparison of methacholine and histamine inhalations in asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1975, 56: 308-316.
14. Chai H., Farr R.S., Froehlich L.A. et al.: Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1975, 56: 323-327.
15. Fish J.E., Rosenthal R.R., Batra G. et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976, 113: 579-586.
16. Klaustermeyer W.B., Hale F.C., Prescott E.J.: Analysis of the methacholine response in bronchial asthma. *Ann. Allergy* 1979, 43: 237-240.
17. Guidelines for standardization of bronchial challenges with (nonspecific) bronchoconstriction agents. Eiser N.M., Kerrebijn K.F., Quanjer P.H. (red.). *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 1983, 19: 495-514.
18. Cockcroft D.W., Berscheid B.A.: Effect of pH on bronchial response to inhaled histamine. *Thorax* 1982, 37: 133-136.
19. Cockcroft D.W., Berscheid B.A.: Slope of the dose-response curve: usefulness in assessing bronchial responses to inhaled histamine. *Thorax* 1983, 38: 55-61.
20. Cockcroft D.W., Berscheid B.A., Murdock K.Y.: Measurement of responsiveness to inhaled histamine using FEV1: comparison of PC20 and threshold. *Thorax* 1983, 38: 523-526.
21. Ryan G., Dolovich M.B., Obminski G. et al.: Standardization of inhalation provocation tests: influence of nebulizer output, particle size, and method of inhalation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1981, 67(2): 156-161.
22. Ryan G., Dolovich M.B., Roberts F.S. et al.: Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981, 123: 195-199.
23. Cockcroft D.W., Berscheid B.A.: Standardization of inhalation provocation tests. Dose vs concentration of histamine. *Chest* 1982, 82(5): 572-575.
24. Rutkowski R., Siergiejko Z., Hofman J. et al.: Wpływ pirenzepiny na reaktywność oskrzeli ocenianą testem metacholinowym metodą ślepej próby u chorych na dychawicę oskrzelową. *Pneum. Pol.* 1989, LVII: 10-12.
25. Rosenthal R.R.: *Methodologies of aerosol delivery. W: Provocation testing in clinical practice. Spector S.L. (red.). Marcel Dekker, New York 1995: 215-229.*
26. Shapiro G.G., Simon R.A., for the American Academy of Allergy and Immunology Bronchoprovocation Committee: Bronchoprovocation committee report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992, 89: 775-778.
27. Sterk P.J., Fabri L.M., Quanjer P.H. et al.: Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Statement of the European Respiratory Society. Eur. Respir. J.* 1993, 6(Suppl.16): 53-83.
28. Juniper E.F., Cockcroft D.W., Hargreave F.E.: Tidal breathing method. In *histamine and methacholine inhalation tests: Laboratory procedure and standardization. Wyd. II. Astra Draco AB, 1994, Lund, Szwecja.*
29. [online: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)].
30. Anderson S.D., Brannan J., Spring J. et al.: A new method for bronchial provocation testing in asthmatic subject using a dry powder mannitol. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 156: 758-765.
31. Anderson S.D., Charlton B., Weiler J.M. et al.: A305 Study Group comparison of mannitol and methacholine to predict exercise-induced bronchoconstriction and clinical diagnosis of asthma. *Respir. Res.* 2009, 10: 4.
32. Świebocka E.M., Siergiejko G., Siergiejko Z.: Mannitol challenge does not confirm bronchial hyperreactivity in some histamine-responsive asthmatic children. *J. Asthma* 2012, 48: 817-821.
33. Fish J.E., Ankin M.G., Kelly J.F. et al.: Regulation of bronchomotor tone by lung inflation in asthmatic and nonasthmatic subjects. *J. Appl. Physiol.* 1981, 89: 1079-1086.
34. Brusasco V., Crimi E., Barisone G. et al.: Airway responsiveness to metacholine: effects of deep inhalations and airway inflammation. *J. Appl. Physiol.* 1999, 87: 567-573.
35. Kapsali T., Permutt S., Laube B. et al.: Potent bronchoprotective effect of deep inspiration and its absence in asthma. *J. Appl. Physiol.* 2000, 89: 711-720.

36. Cockcroft D.W., Davis B.E., Todd D.C. et al.: Methacholine challenge. Comparison of two methods. *Chest* 2005, 127: 839-844.
37. Cockcroft D.W., Davis B.E.: The bronchoprotective effect of inhaling metacholine by using total lung capacity inspirations has a marked influence on the interpretation of the test result. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117: 1244-1248.
38. Prieto L., Lopez V., Llusar R. et al.: Differences in response to methacholine between the tidal breathing and dosimeter methods. Influence of the dose of bronchoconstrictor agent delivered to the mouth. *Chest* 2008, 134: 699-703.
39. Todd D.C., Davis B.E., Hurst T.S. et al.: Dosimeter methacholine challenge: comparison of maximal versus submaximal inhalations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 114: 517-519.
40. Juniper E.F., Syty-Golda M., Hargreave F.E.: Histamine inhalation tests: inhalation of aerosol via facemask versus a valve box with mouthpiece. *Thorax* 1984, 39: 556-557.
41. Hurst T.S., Cockcroft D.W., Hannah V.D. et al.: A comparison of 2 methods of continuous aerosol administration during metacholine challenge testing. *Respir. Care* 2006, 51: 46-48.
42. Parker A.L.: Airway reactivity is a determinant of bronchodilator responsiveness after metacholine-induced bronchoconstriction. *J. Asthma* 2004, 41: 671-677.
43. Coates A.L., Leung K., Dell S.D.: Developing alternative delivery systems for methacholine challenge test. *J. Aerosol. Med. Pulm. Del.* 2014, 27: 66-70.
44. Siergiejko Z., Świebocka E.: Czy chory na astmę może mieć prawidłową reaktywność oskrzeli? *Alergia* 2010, 4: 47-49.
45. [online: <http://www.provocholine.com/Resources/SSM-slides-SEPT8-2010-FINAL.pdf>].

Wkład autorów/Authors' contributions:

Według kolejności.

Konflikt interesów/Conflict of interests:

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support:

Nie występuje.

Etyka/Ethics:

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Adres do korespondencji:

**prof. dr hab. n. med. Zenon Siergiejko**

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Układu Oddechowego i Bronchoskopii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

15-274 Białystok, ul. Waszyngtona 17

e-mail: siergiejko@csk.pl