

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**INFECCIÓN POR *Chlamydia pneumoniae* Y CRISIS
ASMÁTICA: ESTUDIO SEROLÓGICO EN EL ÁREA
10 DE LA COMUNIDAD DE MADRID**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Natividad Rivero García

Bajo la dirección de los doctores

José Ramón Domínguez Pérez
Rafael Enríquez de Salamanca Lorente

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2078-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**INFECCIÓN POR CHLAMYDIA PNEUMONIAE Y CRISIS
ASMÁTICA. ESTUDIO SEROLÓGICO EN EL ÁREA 10 DE LA
COMUNIDAD DE MADRID.**

Natividad Rivero García

Madrid, 2001

“Nada atasca más el progreso de la ciencia
que la idea correcta en el momento inapropiado”.

Vicent de Vigneaud
(Bioquímico canadiense)

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi agradecimiento a los Dres. D. José Ramón Domínguez Pérez y D. Rafael Enríquez de Salamanca Lorente, quienes han dirigido los trabajos de esta tesis, por los consejos dados para su correcta realización y la confianza depositada para llevarla a cabo.

Debo agradecer al personal médico y de enfermería de las Unidades de Hospitalización y Ambulatoria del Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Getafe por su completa colaboración, sin la cual hubiera sido imposible la realización de este estudio.

También quiero agradecer a la Dra. Patricia Auffray Beaudet del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe, por sus enseñanzas en el diagnóstico serológico de las infecciones y a la Dra. Asunción Nieto Barbero del Servicio de Neumología del Hospital 12 de Octubre, amiga y compañera, por su ayuda y apoyo técnico.

Finalmente, y de manera muy especial, quiero agradecer a Natividad García Calatrava, mi madre, por ser la persona que más me ha animado en todo momento a la realización de esta tesis.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ASMA.	3
2.1. DEFINICIÓN DE ASMA.	3
2.2. EPIDEMIOLOGÍA.	4
2.2.1. Prevalencia del Asma.	5
2.3. HISTORIA NATURAL.	7
2.3.1. Infancia.	7
2.3.2. Adolescencia.	7
2.3.3. Edad adulta.	8
2.4. FACTORES DE RIESGO.	8
2.4.1. Factores predisponentes.	8
2.4.2. Factores etiológicos.	9
2.4.3. Factores contribuyentes.	9
2.4.4. Factores desencadenantes de exacerbaciones o “triggers”.	9
2.5. PATOGENÍA Y MECANISMOS PATOLÓGICOS.	11
2.5.1. Mecanismos inmunológicos y mediadores de la inflamación.	11
2.5.1.1. Mecanismos IgE-Dependientes y Linfocitos T-Dependientes.	11
2.5.1.2. Mecanismos IgE-Independientes y Linfocitos T-Dependientes.	12
2.5.1.3. Moléculas de adhesión.	14
2.5.1.4. Células constitutivas de la pared bronquial.	14
2.5.2. Control neural.	15

2.5.3. Histología de la vía aérea.	16
2.5.4. Mecanismos sintomáticos.	17
2.5.5. Limitaciones del flujo aéreo.	18
2.5.6. Alteraciones de los gases en la sangre.	19
2.5.7. Asma nocturno.	19
2.5.8. Infección respiratoria y asma.	20
2.6. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN.	24
2.6.1. Diagnóstico Clínico: síntomas y signos.	24
2.6.2. Medida de la función pulmonar.	25
2.6.3. Medida del estado alérgico.	27
2.6.4. Diagnóstico diferencial.	27
2.6.5. Clasificación del asma.	28
2.6.5.1. Etiología.	28
2.6.5.2. Gravedad.	29
2.6.5.3. Limitación del flujo aéreo.	31
2.6.6. Reagudización del asma.	31
2.7. TRATAMIENTO DEL ASMA.	32
3. CHLAMYDIA PNEUMONIAE.	36
3.1. CHLAMYDIA PNEUMONIAE. ANTECEDENTES.	36
3.2. MICROBIOLOGÍA DE C. PNEUMONIAE.	37
3.3. ESTRUCTURA ANTIGENICA, GENÉTICA Y BIOLOGÍA	39
3.3.1. Genética.	40
3.4. EPIDEMIOLOGÍA.	41
3.4.1 Transmisión.	41
3.4.2. Distribución por edades y sexo.	42

3.4.3. Distribución global de la prevalencia y periodicidad.	43
3.4.4 Modelos animales.	45
3.5. INMUNOLOGÍA Y PATOGÉNESIS.	45
3.5.1. Ciclo vital de <i>Chlamydia</i> .	46
3.5.2. Factores inmunopatológicos de las infecciones por <i>Chlamydia</i> .	48
3.5.2.1. Infección de los monocitos y macrófagos.	49
3.5.2.2. Infección de las células endoteliales.	50
3.5.2.3. Infección de los tejidos inflamados.	50
3.5.3.4. Persistencia de <i>Chlamydia</i> .	50
3.5.2.5. Persistencia de <i>C. pneumoniae</i> y producción de las <i>Heat Shock Proteins</i> .	51
3.5.2.6. Inducción de la persistencia de <i>C. pneumonie</i> .	53
3.5.2.7. Importancia clínica de la infección persistente.	54
3.5.2.8. Terapia antimicrobiana e infección persistente.	55
3.5.2.9. Inmunidad celular y <i>C. pneumoniae</i> .	55
3.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR C. PNEUMONIAE.	56
3.6.1. Infecciones de las vías respiratorias.	57
3.6.2. Enfermedades crónicas pulmonares.	59
3.6.3. Sarcoidosis.	60
3.6.4. Enfermedades extrapulmonares.	60
3.6.5. <i>C. pneumoniae</i> , arteriosclerosis y enfermedad coronaria.	61
3.6.6. Otros cuadros clínicos.	64
3.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.	65

3.7.1. Métodos Directos.	65
3.7.1.1. Aislamiento en cultivo.	65
3.7.1.1.1. Obtención y transporte de las muestras para cultivo.	65
3.7.1.2. Detección directa de antígeno.	67
3.7.1.3. Detección directa de antígeno con técnicas moleculares.	68
3.7.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.	68
3.7.2. Métodos Indirectos.	70
3.7.2.1. Técnicas de Serología.	70
3.7.2.1.1. Test de Microinmunofluorescencia (MIF).	70
3.7.2.1.2. Fijación del Complemento.	71
3.7.2.1.3. Métodos inmunoenzimáticos. Ensayo inmunoabsorbente	
LPS recombinantes (rDNA LPS ELISA).	71
3.7.2.1.4. Inmunocomplejos circulantes.	72
3.7.3. Diagnóstico serológico: respuesta de anticuerpos y	
 criterios diagnósticos.	72
3.7.3.1. Infección aguda.	73
3.7.3.2. Infección crónica.	74
3.8. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR C. PNEUMONIAE.	75
3.8.1. Antimicrobianos y eficacia clínica.	75
3.8.2. Macrólidos en el tratamiento del asma y la enfermedad	
cardiovascular.	79
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	80
4.1. HIPÓTESIS.	80
4.2. OBJETIVO PRINCIPAL.	82
4.3. OBJETIVOS SECUNDARIOS.	82

4.4. OBJETIVOS OPERACIONALES.	82
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	83
5.1. ESTRATEGIA DE ESTUDIO.	83
5.1.1. Población objetivo.	83
5.1.2. Emplazamiento.	83
5.1.3. Tipo de estudio.	83
5.1.4. Sujetos de estudio.	83
5.1.5. Periodo de entrada de los pacientes en el estudio.	84
5.1.6. Variables de estudio.	84
5.1.7. Recogida de datos.	84
5.1.8. Detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos.	85
Anexo 1.	87
Anexo 2.	88
Anexo 3.	89
5.2 DISEÑO ESTADISTICO.	90
6. RESULTADOS.	93
RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA POBLACIÓN.	95
6.1. Análisis de la población asmática y diferencias entre <i>agudos y estables.</i>	104
6.2. Comparación de las tres poblaciones. Diferencias entre asmáticos y población general.	111
7. DICUSIÓN.	114
7.1. DISCUSIÓN DE LA BIBLIOGRAFIA.	115
7.1.1. Primeras evidencias que relacionan la infección por <i>C. pneumoniae</i> y asma.	115

7.1.2. Infección aguda por <i>C. pneumoniae</i> y crisis asmática.	117
7.1.3. Infección persistente e inicio de la enfermedad en el adulto.	120
7.1.4. Infección por <i>C. pneumoniae</i> y aumento de la gravedad del asma.	125
7.1.5. Mejoría de los síntomas asmáticos tras el tratamiento antibiótico específico.	125
7.1.6. Diferencias de seroprevalencias entre asmáticos y no asmáticos.	127
7.2. DISCUSIÓN DEL MÉTODO.	130
7.2.1. Población de estudio.	130
7.2.2. Correlación de los criterios serodiagnósticos con la detección del microorganismo.	130
7.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	134
7.3.1. Diferencias entre asmáticos con crisis y asmáticos estables.	135
7.3.2. Diferencias entre asmáticos y no asmáticos.	140
8. CONCLUSIONES.	147
9. BIBLIOGRAFÍA.	148

1. INTRODUCCION

El asma es una enfermedad crónica inflamatoria de las vías respiratorias que constituye una causa importante de morbilidad, mortalidad y gasto sanitario. Su prevalencia es cada vez mayor afectando entre un 3% y un 5% de la población mundial y con una mortalidad en aumento. Como explicaciones a este aumento de la morbimortalidad se sugiere el mayor número de casos documentados, la mayor exposición ambiental, el mayor acceso a los cuidados médicos, el aumento de sujetos susceptibles genéticamente, la mayor supervivencia de los niños con problemas respiratorios y últimamente se añade la exposición a *Chlamydia pneumoniae*, una bacteria que es causa importante de infección respiratoria y cuya seroprevalencia en la población puede ser muy alta.

Los importantes avances producidos en el conocimiento de la patogenia del asma han puesto de relieve la importancia de los mecanismos inflamatorios y de la hiperreactividad bronquial, y han permitido disponer de tratamientos de gran utilidad en el control de la enfermedad, aunque no curativos. A pesar de su origen inflamatorio, existen indicios de la capacidad de organismos intracelulares como los virus respiratorios y bacterias como *Mycoplasma pneumoniae* y especialmente *Chlamydia pneumoniae* de estar implicados en la etiopatogénesis, exacerbaciones y progresión de la enfermedad asmática.

La infección respiratoria aguda por *Chlamydia pneumoniae* es asintomática en la mayoría de los casos, pero puede manifestarse con broncoespasmos y sibilancias. Existen evidencias serológicas que indican una alta seroprevalencia de la infección entre los enfermos de asma y desde hace unos años se viene observando una relación entre la infección aguda y el desencadenamiento de las crisis asmáticas, así como entre la infección persistente y el inicio del asma en el adulto.

Otra observación ha sido la mejoría sintomática y funcional en pacientes asmáticos tratados con antibióticos activos frente a *Chlamydia pneumoniae* y se ha sugerido su uso en los asmáticos con serología positiva a *C. pneumoniae*, aunque no se ha establecido la duración ni cuando iniciar dicho tratamiento. Si *Chlamydia pneumoniae* provoca crisis asmáticas quizás se pueda recomendar la antibioterapia específica en el tratamiento empírico de las exacerbaciones junto al resto de medidas terapéuticas. Sin embargo los datos publicados que indican la seroprevalencia de la infección en asmáticos y la frecuencia de exacerbaciones asociadas a la presunta infección aguda varían en función de las poblaciones estudiadas y del área geográfica.

Chlamydia pneumoniae es una bacteria con amplia distribución mundial y por lo tanto la seroprevalencia e incidencia de la infección pueden ser muy altas en la población general de una zona determinada. En consecuencia, la seroprevalencias halladas en los asmáticos y las mejorías observadas tras el tratamiento antibiótico pueden ser meramente coincidentes con los datos esperados en la población general. Así mismo la infección aguda asintomática o subclínica puede también ser lo habitual en el asmático como ocurre en la población general. La relación entre la infección aguda por *C. pneumoniae* y el desencadenamiento de la crisis asmática puede entonces no ser significativa sino casual. De ser así debería reservarse el uso de la antibioterapia específica para casos concretos de asma con infección por esta bacteria. Para valorar el papel de la infección en el desencadenamiento de las crisis asmáticas, es necesario conocer también la frecuencia de infecciones agudas en los asmáticos asintomáticos o estables y no solo frente a la población general.

Pretendemos saber si existe un aumento del riesgo de tener crisis asmática ante la presencia de presunta infección aguda por *C. pneumoniae*, y conocer el perfil serológico de la infección en la población asmática de nuestra Área.

2. ASMA

2.1. DEFINICION DE ASMA.

En 1962 la American Thoracic Society (ATS) define “hiperreactividad bronquial” como una respuesta anormal de la vía aérea ante determinados estímulos, pero posteriormente en 1987 incorpora el concepto de inflamación y destaca el papel de los fenómenos inflamatorios en la patogenia del asma^{1,2}. Actualmente la definición más aceptada es la del grupo de trabajo del National Institute of Health y la World Health Organisation (NHBL/WHO) publicada en 1995 y reimpressa en 1996 que incluye datos patológicos, clínicos y funcionales aceptándose que: “El asma es un proceso inflamatorio crónico de las vías respiratorias, con variaciones en la magnitud de la respuesta inflamatoria que reflejan la actividad clínica del asma”. Desde el punto de vista funcional, muchas células están implicadas en el proceso inflamatorio, en particular los mastocitos, eosinófilos y linfocitos T. En individuos susceptibles, esta inflamación provoca episodios recurrentes de disnea, sibilancias, opresión torácica y tos, más intensos durante la noche y/o primeras horas de la mañana. Estos síntomas usualmente se asocian a una amplia y variable limitación del flujo aéreo, que es al menos parcialmente reversible de forma espontánea o con tratamiento. Esta inflamación crónica además causa un aumento de la reactividad bronquial a una variedad de estímulos siendo la atopia o predisposición para desarrollar una respuesta inmune mediada por la inmunoglobulina E (IgE) en respuesta a alérgenos medioambientales el principal factor predisponente y con más evidencias para desarrollar asma”³.

Para estudios epidemiológicos, la definición de asma supone la presencia de síntomas asmáticos durante el último año asociado con hiperreactividad de la vía aérea. Un aumento de la reactividad en respuesta a los test de histamina o metacolina, la variabilidad del *flujo espiratorio máximo* o PEF a lo largo de 24 horas superior o igual al 20% y el aumento de volumen espiratorio en un segundo o FEV₁ de un 15% o más respecto a la línea de base tras la inhalación de agonistas beta-2 adrenérgicos de acción corta, son criterios aceptados para confirmar objetivamente un diagnóstico de asma³.

La inflamación de la vía aérea produce cuatro formas de limitación del flujo aéreo: la broncoconstricción aguda, el engrosamiento de la pared, la formación crónica de un tapón de moco y la reconstrucción de la pared de las vías respiratorias.

La consideración del asma como un desorden inflamatorio por lo tanto tiene implicaciones en el diagnóstico, prevención y tratamiento.

2.2. EPIDEMIOLOGIA.

Los términos relacionados con la epidemiología del asma incluyen los siguientes:

- ◆ **Prevalencia.** Porcentaje de población que padece la enfermedad. Prevalencia acumulada es la suma total de las personas que han padecido la enfermedad en un periodo de tiempo. Puntual, el número de personas con la enfermedad en un momento dado.
- ◆ **Incidencia.** El número de individuos que desarrollan la enfermedad, o casos nuevos diagnosticados, a lo largo de un periodo de tiempo (habitualmente un año) expresado como porcentaje de población.
- ◆ **Morbilidad.** Grado de afectación y deterioro de la calidad de vida del enfermo.

- ◆ **Reactividad bronquial.** Respuesta constrictora de las vías respiratorias a estímulos provocadores.
- ◆ **Hiperreactividad bronquial.** Estrechamiento excesivo y fácil de la vía aérea en respuesta a diversos estímulos provocadores. Se necesitan parámetros objetivos para asegurar la presencia de hiperreactividad de la vía aérea. Se ha estandarizado el uso de aerosoles de histamina y metacolina para provocar y medir la hiperrespuesta.
- ◆ **Atopia.** Propiedad adquirida genéticamente para desarrollar una respuesta inmune exagerada mediada por IgE ante alérgenos habituales en el medio ambiente.

2.2.1. Prevalencia del asma.

La prevalencia exacta del asma se estima entre el 7% y el 10% de la población total con una mortalidad que oscila entre el 0,5% y el 4%. En niños, varía de casi el 0% al 30% según poblaciones. La incidencia también varía entre distintos países, siendo Australia el país con las cifras más altas de incidencia (9,9%) y prevalencia. Papúa Nueva Guinea y China se encuentran en el extremo opuesto con una incidencia entre el 0% y el 1,2% respectivamente. En España la incidencia es similar a la de otros países europeos y Estados Unidos oscilando entre un 5-10% en pacientes con edades entre los 20-40 años. Se calcula que unos 100 millones de personas en el mundo pueden estar afectadas^{4,5,6}. Afecta a todas las poblaciones y razas, independientemente del nivel de desarrollo socioeconómico aunque la prevalencia es mayor en países desarrollados. No existen datos que determinen si las diferencias entre poblaciones se deben a la exposición a distintos factores medioambientales aunque se ha sugerido que la atopia es menos frecuente en pacientes con tasas altas de infestación parasitaria. El nivel socioeconómico si parece influir en el

aumento de la gravedad del asma, en relación con el acceso a los cuidados médicos adecuados y quizás a la vivienda⁷.

Varios factores parecen favorecer el actual aumento de casos principalmente entre la población joven e infantil, lo que plantea importantes problemas médicos y sociales^{3,8,9,10}. Aunque no se conocen las razones de este incremento se cree que es debido a cambios en el medio ambiente, principalmente aeroalergenos, polucionantes ambientales, humo del tabaco, posibles factores dietéticos aun no definidos y antígenos infecciosos como *Chlamydia pneumoniae* cuyo aumento en la prevalencia de la infección se ha correlacionado con el aumento de los casos de asma en adultos^{11,12,13,14}.

Los datos de mortalidad aportados por los distintos países son limitados y poco representativos de las diferentes poblaciones debido a la escasez de notificaciones pero parecen advertir un aumento de las muertes por asma. Se han sugerido como hipótesis una mayor gravedad de la enfermedad y falta de reconocimiento de los síntomas que lo indican por parte del personal sanitario, el manejo inadecuado en pacientes jóvenes y causas iatrógenas^{15,16}.

La calidad de vida de estos pacientes se ve afectada al plantear restricciones de carácter físico, emocional y en la vida social de los pacientes siendo una importante causa de absentismo laboral y escolar. Si no se evalúa suficientemente el problema y los cuidados médicos no son los apropiados las dificultades pueden aumentar. Diferentes escalas y cuestionarios basadas en características físicas y psicológicas intentan medir y dar un índice de la calidad de vida del paciente aunque ninguna ha sido empleada para estudios comparativos entre poblaciones.

Siguen siendo necesarios estudios amplios de la población afectada y de costes terapéuticos mediante el uso de protocolos bien diseñados y metodologías estandarizadas.

2.3. HISTORIA NATURAL DEL ASMA

La evolución del asma es diferente dependiendo de la edad de inicio y posible etiología.

2.3.1. Infancia.

Aunque el asma puede desarrollarse desde los primeros meses de vida, es difícil hacer el diagnóstico definitivo en menores de 5 años. La causa más habitual de sibilancias respiratorias y broncoespasmo suele ser las infecciones respiratorias por organismos intracelulares como los virus o las *Chlamydias*. Parece que la función reducida de los pulmones, por su pequeño tamaño, puede ser responsable de las sibilancias infantiles las cuales se resuelven con el crecimiento. A su vez en niños susceptibles, la atopia y en particular la exposición precoz a alérgenos de animales domésticos, son los principales predisponentes de los episodios repetidos de sibilancias.

2.3.2. Adolescencia.

La atopia y exposición a alérgenos domésticos siguen siendo los principales factores predisponentes para el desarrollo de asma. Las infecciones respiratorias pueden ser desencadenantes de exacerbaciones, pero su papel en el inicio de la enfermedad aun no está esclarecido.

El crecimiento del pulmón parece relativamente normal en los niños mayores con asma pero puede estar reducido en adolescentes con síntomas graves y persistentes. No se conoce si el fallo en el crecimiento pulmonar es un reflejo de la enfermedad asmática o se debe a la presencia de pulmones pequeños congénitos.

Estudios longitudinales sugieren que el asma desaparece en un 30-50% de los niños al llegar a la pubertad, aunque pueden permanecer con una función pulmonar alterada, hiperreactividad bronquial o tos persistentes¹⁷ y más de dos tercios continuarán con la enfermedad en la edad adulta, con más riesgo de efectos secundarios a largo plazo y compromiso del flujo respiratorio en aquellos con asma moderada o grave.

2.3.3. Edad adulta.

El asma de inicio en la vida adulta responde a la sensibilización por exposición a agentes profesionales o al desarrollo de una atopia posterior. Tampoco se conoce el papel de las infecciones respiratorias en el inicio de la enfermedad en el adulto.

La limitación permanente del flujo aéreo y la presencia de anomalías en las vías aéreas observadas por tomografía computarizada son habituales en adultos con asma.

2.4. FACTORES DE RIESGO.

El asma es un desorden inflamatorio crónico de las vías aéreas, producto de la interacción de una serie de factores genéticos y ambientales que originan cambios inflamatorios que dan lugar a una obstrucción de la luz bronquial e hiperreactividad exagerada ante determinados estímulos (tabla 1).

2.4.1. Factores predisponentes.

Son aquellos que dan al individuo una susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad. La atopia, condición genética para producir cantidades aumentadas de IgE en respuesta a diversos antígenos es el principal factor para la aparición del asma. La exposición temprana a los antígenos desencadenarían el proceso inflamatorio y la

exposición permanente mantendrían el mecanismo. Pero siendo la prevalencia de atopia en la población general del 30 al 50 %, la prevalencia media de asmáticos es mucho menor lo que sugiere que el asma se asocia con atopia sólo en una cierta proporción de sujetos.

Otros factores predisponentes estarían relacionados con alteraciones genéticas en la regulación del sistema inmune (linfocitos T) como veremos al repasar la patogenia.

2.4.2. Factores etiológicos.

Son aquellos capaces de sensibilizar la vía aérea e iniciar el proceso asmático. Los más importantes agentes causales en términos de número de gente expuesta son los alérgenos inhalados como el epitelio y pelo de animales domésticos, ácaros, hongos, pólenes, sustancias medioambientales y asma ocupacional⁶. Tras una exposición prolongada estos agentes son capaces de inducir un estado de sensibilidad, mediante el desarrollo de linfocitos T de memoria e IgE específica, predisponiendo al desarrollo de una inflamación alérgica inicial y posteriores exacerbaciones tras la reexposición al alérgeno incluso en pequeñas cantidades.

2.4.3. Factores contribuyentes.

Aumentan la probabilidad de desarrollar asma tras la exposición a un agente causal y pueden aumentar la susceptibilidad. Son el tabaco, la polución, la dieta, infecciones, etc.

2.4.4. Factores desencadenantes de exacerbaciones o “ triggers”.

Inducen inflamación de la vía aérea o provocan broncoespasmo en enfermos con asma. Varían con el individuo y con el tiempo. Los triggers pueden causar exacerbación

pero no son factores causales. Entre ellos se incluyen el frío, el ejercicio, fármacos, infecciones, hiperventilación, etc.

Tabla 1. Factores de riesgo. Modificada de ref. 3.

FACTORES DE RIESGO QUE CONDUCEN AL DESARROLLO DE ASMA

Factores predisponentes

- θ Atopia
- θ Genéticos

Factores causales

- θ Alérgenos medio ambientales
- θ Pelos y escamas de animales domésticos
- θ Aves
- θ Pólenes
- θ Hongos
- θ Fármacos (aspirina, antiinflamatorios no esteroideos y anticonceptivos)
- θ Sensibilizantes ocupacionales o profesionales

Factores contribuyentes

- θ Infecciones respiratorias
- θ Bajo peso al nacer
- θ Dieta
- θ Polución ambiental
- θ Tabaco
 - Fumadores activos
 - Fumadores pasivos

FACTORES QUE EXACERBAN UN ASMA: TRIGGERS

- θ Alérgenos
- θ Infecciones respiratorias
- θ Ejercicio e hiperventilación
- θ Dióxido de sulfuro
- θ Clima
- θ Dieta, aditivos, fármacos

2.5. PATOGENIA Y MECANISMOS PATOLÓGICOS

Diversos mecanismos inmunológicos y no inmunológicos están involucrados en la inflamación crónica de la vía aérea y en las exacerbaciones de la enfermedad asmática en respuesta a una variedad de estímulos (figura 1).

2.5.1. Mecanismos inmunológicos y mediadores de la inflamación.

2.5.1.1. Mecanismos IgE-Dependientes y Linfocitos T-Dependientes.

Son el principal mecanismo implicado en la patogenia del asma. Se producen tras la presentación de un antígeno ligado a las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por las células presentadoras de antígenos (macrófagos, linfocitos B, células dendríticas) a los linfocitos T (LT) específicos de antígeno, los cuales inducirán la producción de IgE específica por los linfocitos B (LB). Tras la sensibilización, la reexposición del tejido al alérgeno aumentará la producción de IgE específica que se unirá a los receptores específicos situados sobre la membrana basal de las células cebadas, basófilos, eosinófilos (Fc epsilon RI), macrófagos y plaquetas (Fc epsilon RII). La unión sobre la célula, del alérgeno a la IgE específica conduce a la generación y liberación de mediadores que activarán la cascada inflamatoria¹⁸. Las células cebadas y los basófilos a su vez desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la respuesta alérgica y síntesis de IgE a través de la producción de interleukina 4 (IL-4).

2.5.1.2. Mecanismos IgE-Independientes y Linfocitos T-Dependientes.

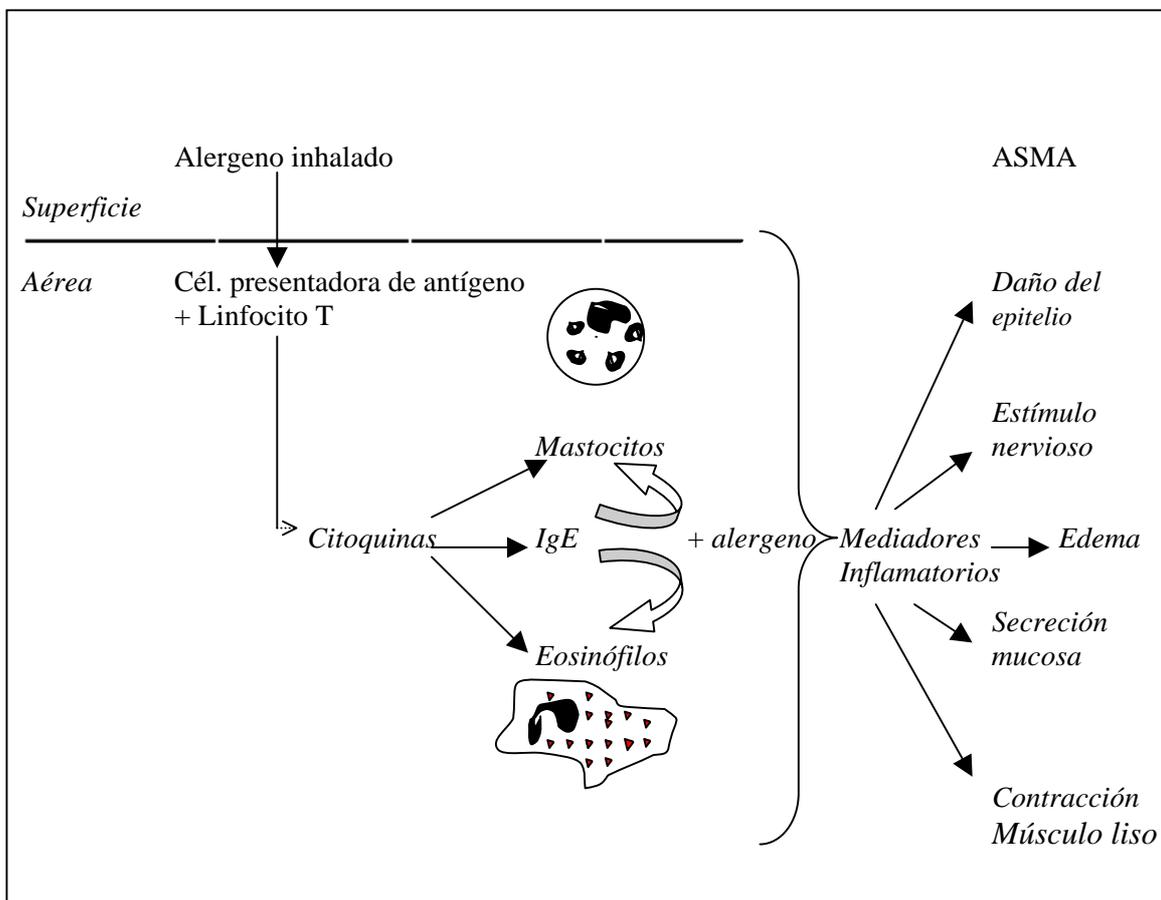
Una vez sensibilizado el sujeto al antígeno, la reexposición provoca la activación de los LT con capacidad para estimular la producción de IgE (función “helper” o auxiliadora). Los LT “helper” (LTh) también pueden liberar citocinas que causan la acumulación y activación de leucocitos, sobre todo eosinófilos, y así actuando como células proinflamatorias activar de forma indirecta la cascada inflamatoria. Además de estimular a los leucocitos polimorfonucleares, los LTh activados son fuente de distintas citocinas, pertenecientes a cinco generos distintos que incluyen al factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que tienen pronunciados efectos sobre las células inflamatorias. De esta forma los LT inician y propagan la respuesta inflamatoria participando también como responsables de las exarcebaciones asmáticas^{18,19}.

Se distinguen dos tipos de LTh, subtipo CD4+, según la producción de citocinas: Th1 y Th2.

Ambos secretan IL-3 y GM-CSF pero los Th1 producen principalmente; IL-2, que estimula la propia producción de los LT, interferon-gamma (IFN- γ), que inhibe la activación de los LB y la síntesis de IgE, y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). Estas citocinas son responsables de la clásica reacción de hipersensibilidad retardada²⁰.

El tipo Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 pero no secreta IL-2 ni IFN- γ . Estas citocinas actúan sobre los LB, mastocitos y eosinófilos y se les considera responsables de las reacciones de hipersensibilidad inmediata o tipo 1 asociadas a procesos alérgicos. Existen estudios que muestran un aumento de la proporción de linfocitos Th2 en la sangre periférica de individuos atópicos²¹.

Figura 1. Interrelación entre la inflamación de la vía aérea y el desarrollo de síntomas en el asma, hiperreactividad bronquial y limitación del flujo aéreo. Modificada de ref. 3.



A diferencia de los linfocitos “helper” o auxiliares, los linfocitos CD8+ o citotóxicos reconocen antígenos endógenos presentados por moléculas de clase I del MHC. Esta inmunidad celular está relacionada con la respuesta a infecciones por agentes intracelulares y a tumores, pero existen evidencias de la implicación de este tipo de respuesta en algunas formas de asma²².

Existe también una interacción entre los linfocitos T y los eosinófilos, siendo los primeros capaces de modular la adherencia, locomoción y activación de los segundos para causar daño tisular^{19,23}. Se ha encontrado un aumento en el número de linfocitos T activados CD25+, los cuales expresan el receptor para la IL-2, eosinófilos y mastocitos en

biopsias bronquiales de pacientes atópicos y no atópicos con asma así como la expresión de RNA mensajero de IL-5 en biopsias bronquiales de pacientes atópicos con asma^{18,19}. La IL-5 es una citoquina regulador de los eosinófilos y su nivel de expresión en la mucosa respiratoria de los pacientes se correlaciona con marcadores de actividad de linfocitos T y eosinófilos.

2.5.1.3. Moléculas de adhesión.

El reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos en la vía aérea es paralelo al aumento de moléculas de adhesión específicas en las células endoteliales venulares postcapilares^{3,19}. Se incluyen la selectina-E, la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1), y la molécula-1 de adhesión a células vasculares (VCAM-1). Estas moléculas aumentan la actividad de ligandos (lectinas e integrinas) sobre los linfocitos activados y su regulación por las citoquinas y mediadores permite a los leucocitos cruzar la pared postcapilar de las vénulas y migrar a la mucosa.

2.5.1.4. Células constitutivas de la pared bronquial.

También es interesante conocer que las células normales residentes en la vía aérea de los pacientes con asma pueden generar una serie de citoquinas que contribuyan a la cronicidad de la inflamación. El epitelio es una fuente de IL-6, IL-8, GM-CSF, IL- β y TNF- α . El endotelio puede generar IL-1 β , IL-5 y GM-CSF, y los fibroblastos son una importante fuente de factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células “stem”, GM-CSF e IL-8³. Todas estas citoquinas proporcionan un mecanismo no inmunológico que aumenta y mantiene la respuesta inflamatoria.

2.5.2. Control neural de la vía aérea.

En el pasado se pensaba que un incremento en la actividad parasimpática del sistema nervioso autónomo podía ser responsable de la hiperreactividad bronquial en los pacientes con asma pero posteriormente se ha mostrado la presencia de múltiples y complejos mecanismos nerviosos. La demostración de una extensa red de fibras nerviosas conteniendo potentes péptidos, además de los clásicos neurotransmisores y mecanismos adrenérgicos y colinérgicos junto a los no adrenérgico y no colinérgicos, ha revivido el interés por las posibles anomalías en el control neural de la vía aérea y su relación en la patogénesis del asma²⁴

La substancia P (SP), neurokinina A (NKA), neurokinina B (NKB), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) son los neuropéptidos mejor caracterizados. Algunos irritantes provocan broncoconstricción refleja mediada vagalmente, estimulando las fibras sensoriales para soltar SP y NKA con efectos sobre la vía aérea. Los neuropéptidos pueden contribuir al desarrollo de la mayoría de los signos y síntomas de las exacerbaciones asmáticas como la hipersecreción de moco, la contracción del músculo liso, la extravasación del plasma, la activación de las células inflamatorias y su adhesión. La endopeptidasa neutral (NEP) es una enzima presente en la superficie de las células con receptores para los neuropéptidos (por ejemplo epitelio aéreo, músculo liso y endotelio) que corta e inactiva los neuropéptidos, limitando la concentración de los receptores celulares y modulando la respuesta. Un aumento en la liberación de neuropéptidos, la disminución de la actividad de la NEP o ambos pudieran estar involucrados en las crisis asmáticas²⁵.

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) localizado en fibras colinérgicas aferentes de la vía aérea, actúa como cotransmisor con la acetilcolina y puede actuar como freno de la broncoconstricción inducida por el sistema colinérgico. Las células inflamatorias como

eosinófilos, neutrófilos y mastocitos liberan diversas peptidasas, como la triptasa, capaces de degradar el VIP, dando lugar a un reflejo colinérgico exagerado con hiperreactividad e inflamación de la vía aérea.

El óxido nítrico (NO) es un gas reactivo que se obtiene de la arginina a través de la acción de la sintetasa del óxido nítrico, enzima cuya producción en el asma parece regularse en el epitelio. El NO es un potente vasodilatador y broncodilatador, probablemente implicado en la regulación del flujo sanguíneo pulmonar y de la vía aérea y en la regulación del sistema inmune actuando como neurotransmisor de las fibras inhibitorias no colinérgicas-no adrenérgicas. Una producción anómala de NO puede estar relacionada con la fisiopatología de la asma²⁶.

2.5.3. Histología de la vía aérea.

El epitelio bronquial supone la primera barrera al paso de partículas inertes y microorganismos consiguiendo su eliminación mediante la producción de moco, citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, fibronectina y endopeptidasas neurales. La membrana basal en los enfermos asmáticos se encuentra engrosada por estimulación de los miofibroblastos, además de presentar un menor número de cilios en las células epiteliales con presencia de áreas desnudas consecuencia a su vez de una mayor descamación. La submucosa está edematizada con presencia de eosinófilos, proteasas, radicales libres de oxígeno y TNF. La respuesta del epitelio en esta situación ante los estímulos externos es mayor y la reparación de las células epiteliales es defectuosa debido a la expresión de un protooncogen que regula genes participantes en el ciclo celular. La estimulación de los miofibroblastos se acompaña de la presencia de colágeno III y IV, fibronectina e inmunoglobulina G, sin que se afecte por los corticoides. Hay mayor cantidad de células inflamatorias como eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, macrófagos, mastocitos y células plasmáticas que en las

personas sin asma. Hay liberación de interleucina IL-5 y leucotrienos por parte de los eosinófilos con acción vasoactiva, así como proteínas tóxicas que contribuyen al daño tisular. A su vez la histamina y arilsulfatasa liberadas por los eosinófilos contrarrestan a los componentes inflamatorios así como los linfocitos T-helper regulan activamente el componente inflamatorio de la mucosa y la producción de IgE. Los macrófagos colaboran con la liberación de leucotrienos, factor de crecimiento plaquetario, radicales libres de oxígeno, citocinas y eicosanoides mientras que los mastocitos desgranulados producen más tripsina, histamina, prostaglandina y proteasas contribuyendo a la vasoconstricción, el edema y la mayor secreción de moco^{27,28,29}.

Con todos estos fenómenos la histología de la vía aérea del asmático se caracteriza por un engrosamiento por depósitos de colágeno, fibronectina y elastina en la membrana basal, con fragmentación de las fibras superficiales de elastina, formación de neovasos, hiperplasia e hipertrofia de la musculatura lisa y glándulas mucosas^{30,31}. El resultado funcional es un aumento de la vasoconstricción, hiperreactividad, obstrucción bronquial, mayor rigidez de la vía y menor reversibilidad del estado fisiopatológico³.

2.5.4. Mecanismos sintomáticos.

Los síntomas característicos son tos, opresión torácica, sibilancias y disnea³. Los pacientes experimentan diferentes combinaciones con intensidad variable de estos síntomas. La tos es probablemente producida por la estimulación de nervios sensoriales por parte de los mediadores inflamatorios siendo un síntoma particularmente importante sobre todo en niños con asma. La opresión torácica y las sibilancias son debidas en su mayor parte a la limitación del flujo aéreo. La disnea probablemente refleja el aumento del trabajo respiratorio, de la actividad muscular, los cambios en la distensibilidad pulmonar y el estímulo neuronal directo de los mediadores de la inflamación.

2.5.5. Limitación del flujo aéreo.

Todos los mecanismos y respuestas implicados en el proceso inflamatorio contribuyen directa o indirectamente a la limitación del flujo aéreo en el asma; contracción del músculo liso, formación de moco, edema, etc. Los muchos factores que pueden contribuir a la limitación del flujo aéreo, también varían entre individuos con asma y dentro de cada individuo conduciendo a una marcada variabilidad en la presentación clínica, lo que lleva a considerar al asma como la expresión clínica de diferentes mecanismos patógenos.

La bronconstricción aguda puede ser secundaria a la hiperreactividad bronquial provocada por la inhalación de alérgenos a través de mediadores liberados por los mastocitos. Se han realizado mediciones de mediadores en muestras de lavado bronquioalveolar de pacientes, que junto con el uso de inhibidores específicos y antagonistas, sugieren que los leukotrienos (C4 y D4), prostaglandinas (PGD₂, TxA₂ Y PGF₂-α) e histamina son los mediadores con mayor implicación en la limitación del flujo aéreo inducida por alérgenos inhalados. El ejercicio y el suero salino hipertónico pueden provocar limitación del flujo aéreo por estimulación directa, no a través de IgE, de los mastocitos. La respuesta provocada por estos mediadores es posiblemente debida a su acción sobre el músculo liso más que una vasodilatación o formación de edema y ayudándose de los reflejos neurales que aumentarían dicha respuesta a través de la liberación de neuropéptidos.

Una característica del asma es la reversibilidad de la limitación del flujo aéreo. La variabilidad diaria en el grado de limitación se correlaciona con el grado de hiperreactividad de la vía aérea. La hiperrespuesta y limitación transitoria del flujo aéreo, asociadas a las exacerbaciones asmáticas y los síntomas provocados, pueden ser prevenidos con el uso de antiinflamatorios, pero la mayoría de los sujetos con asma tienen

hiperreactividad incluso cuando están asintomáticos y tras un tratamiento antiinflamatorio eficaz. Esto puede ser atribuido al aumento de redes neurales y la remodelación de la vía aérea, que conduce a cambios estructurales y funcionales permanentes en las células^{3,32}. También existen pacientes que debido a la hipertrofia del músculo liso, la fibrosis subepitelial y el engrosamiento de la pared desarrollan una limitación irreversible del flujo aéreo. En pacientes con asma ocupacional se ha observado que incluso tras el cese de la exposición, el asma no desaparece sino que incluso puede empeorar. Recientes estudios muestran una inflamación continua de la vía aérea lo que sugiere que una vez iniciado el proceso inflamatorio, este puede continuar incluso en ausencia de exposición ambiental.

2.5.6. Alteraciones de los gases en la sangre.

Un asma estable y bien controlado se asocia con una buena ventilación-perfusión y su reflejo gasométrico. Las exacerbaciones se asocian con una combinación variable de hipoxemia e hipocápnia, hipoxemia y normo o hipercápnia con acidosis, hipocápnia leve con alcalosis respiratoria y normo o hipoxemia leve, dependiendo de la gravedad. La hipoxemia suele deberse a las alteraciones en la distribución del oxígeno debido a la inflamación de la vía aérea, pero la hipercápnia es probablemente debida al fallo de la bomba respiratoria³.

2.5.7. Asma nocturno.

La presencia de síntomas asmáticos que interrumpen el sueño por la noche o en la madrugada es otra característica de la enfermedad asmática. El aumento de la actividad parasimpática y disminución de la actividad dilatadora noradrenérgica, junto al aumento de la capacidad residual funcional y de la inflamación de la vía aérea durante la noche, juegan

posiblemente un papel en la patogénesis de la limitación del flujo aéreo durante la noche³³. También pueden contribuir alérgenos presentes en el lugar de descanso, la disminución del aclaramiento mucociliar, la hipoventilación o hiperventilación y el reflujo gastroesofágico.

2.5.8. Infección respiratoria y asma.

Existen aspectos epidemiológicos de la enfermedad asmática como es el aumento de su prevalencia a nivel mundial que no están esclarecidos y que pueden estar relacionados con cambios no sólo medio ambientales sino también del estilo de vida e higiénico-sanitarios, en concreto la influencia de las infecciones en el desarrollo de la inflamación y especialmente de las infecciones causadas por organismos intracelulares³⁴.

Tradicionalmente se han asociado las infecciones respiratorias por virus con el desencadenamiento del asma, fundamentalmente en niños, y se ha denominado “asma infecciosa”, cuando la enfermedad comienza tras una infección aguda respiratoria como una bronquitis o neumonía³⁵. Sin embargo el papel de las infecciones en la infancia y los cambios en los patrones de colonización intestinal que actúan como primer estímulo antigénico pueden tener un papel contradictorio en el desarrollo de la atopia. Se ha observado una baja prevalencia de atopia en niños que han estado expuestos a *Mycobacterium tuberculosis* y en jóvenes con infección antigua por virus de la hepatitis A y sarampión^{36,37,38}. Estas infecciones estimulan la respuesta inmune celular Th1 (figura 2) que puede dar lugar a una desviación y predominio de dicha respuesta frente a la respuesta Th2, de predominio alérgico, que otorgaría un papel protector frente a la atopia. Hay estudios que relacionan la historia de infecciones en menores de 3 años con mayor riesgo de asma³⁹, pero la mayoría de los estudios retrospectivos apoyan una relación inversa. También la colonización por las bacterias intestinales en la primera infancia desencadenan un potente estímulo a favor de la respuesta Th1⁴⁰, mientras que las infecciones parasitarias

son potentes inductores de la respuesta Th2 y secreción de IgE⁴¹. Los cambios en la flora intestinal derivados del uso excesivo de antibióticos en los niños y las vacunaciones pueden mantener la polaridad del sistema Th2, el cual es predominante en el sistema inmune fetal en respuesta a los antígenos maternos⁴², en detrimento de Th1 y favorecer así los procesos alérgicos. Si la colonización bacteriana intestinal es anterior a la exposición a un alérgeno, el estímulo bacteriano puede tener un papel protector frente a la atopia, pero si es posterior, puede dar lugar a exacerbaciones del fenotipo asmático.

Por otro lado, las infecciones virales e incluso las vacunas con virus vivos atenuados producen un aumento transitorio de la hiperreactividad bronquial debido al daño en el epitelio bronquial e infiltración mucosa por linfocitos y eosinófilos, activando los mecanismos neurales de broncoconstricción y secreción de citocinas proinflamatorias⁴³. El virus respiratorio sincitial (VRS), y otros como adenovirus, rinovirus, influenza y parainfluenza dan lugar a sibilancias y pueden provocar exarcebaciones. Son consideradas la causa más frecuentes de exacerbación⁴⁴ aunque la frecuencia de agudizaciones por causa infecciosa es variable según autores y según los patógenos considerados, métodos de detección y la edad de los enfermos oscilando del 20% al 89%⁴⁵. Los RSV se consideran responsables del desencadenamiento del asma en el 9% al 42% de los casos totales^{44,46,47,48} y hasta del 85% en períodos epidémicos⁴⁹. En los niños, el RSV y el parainfluenza son los más comunes, dando lugar a la producción de IgE específica frente a ellos. Otros virus implicados son el virus de la gripe, los coronavirus y los enterovirus^{44,46}.

Existen menos estudios en los adultos pero se considera a los virus como inductores de la enfermedad en un 10% de los casos globales y desencadenantes de las crisis en torno a un 55%, alcanzando el 89% en los casos asociados a virus catarrales comunes (rinovirus, coronavirus, influenza)^{50,51,52}. Uno de los primeros estudios longitudinales con asmáticos de larga duración, comparando periodos de reagudización con periodos asintomáticos en el

que se buscaba la presencia de infección respiratoria viral, encontró que el 80% de los pacientes con sibilancias y opresión torácica o disnea presentaba infección respiratoria de las vías altas por virus respiratorios y junto a ellos por *Chlamydia pneumoniae*⁵².

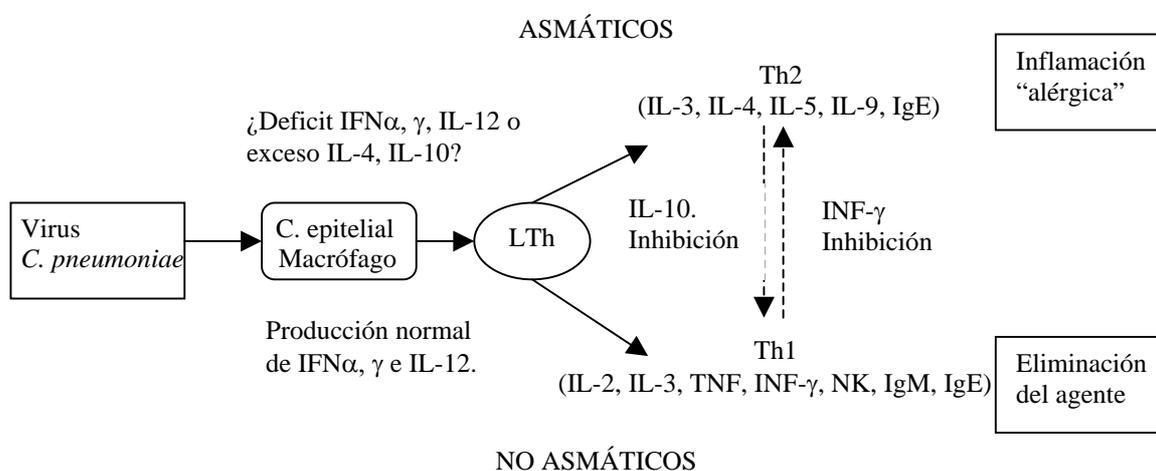
Las bacterias intracelulares parecen tener también un destacado papel como desencadenantes de las crisis asmáticas en concreto *C. pneumoniae*^{46,49,53,54} y *Mycoplasma pneumoniae*. Algunas series han encontrado entre un 9% y un 19% de casos de crisis asmáticas relacionados con *C. pneumoniae*^{48,55}. También se ha considerado a *M. pneumoniae* causa de exacerbaciones hasta en un 25% de los casos^{46,56,57}. También en niños se ha identificado a *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* como agentes desencadenantes de exacerbaciones, predominando el primero^{58,59,60,61}.

El papel que desempeña la infección en el inicio y posterior desarrollo de la enfermedad asmática aún no se conoce del todo. Es frecuente recoger el antecedente inmediato de una infección respiratoria en el asma del adulto. Las respuestas celulares Th1 y Th2 se inhiben recíprocamente mediante la producción de IFN- γ e IL-10 respectivamente (figura 2). La respuesta Th1 es nociva para los virus, y por lo tanto favorable al huésped. Un predominio de esta respuesta explicaría las exacerbaciones producidas por los virus pero no que una infección remota aumentase el riesgo de desarrollar asma en el futuro. Por otro lado los cambios inflamatorios y la hiperreactividad pueden persistir en el epitelio respiratorio (especialmente en alérgicos) una vez pasada la fase sintomática de la infección por rinovirus e independientemente de la replicación viral^{62,63,64}. También se ha comprobado que virus como el VRS, causante de bronquiolitis y al que se ha asociado con el desarrollo posterior de asma infantil⁶⁵, produce la glucoproteína G que es reconocida como antígeno por las células Th2, que al activarse inhibe la respuesta Th1 que eliminaría el virus, favoreciendo así su diseminación y da lugar al aflujo de eosinófilos e hipersecreción mucosa. Otros virus producen sustancias homologas a la IL-10

y péptidos que bloquean el $\text{INF-}\gamma^{66,67}$. Así mismo se ha implicado a la infección persistente por adenovirus como promotora de los síntomas crónicos del asma⁶⁸. Las infecciones por *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* también desencadenan una respuesta Th1 (figura 2), pero sólo en el caso de *C. pneumoniae* existen artículos que relacionan la infección aguda con el inicio y desarrollo posterior del asma, y la contribución de la infección a los síntomas de la enfermedad crónica⁶⁹. Además se ha relacionado la mejoría de los síntomas y de la función pulmonar tras la administración de tratamiento antimicrobiano específico, en el asma moderada y crónica⁷⁰. No sabemos si también existe una inactivación de la respuesta Th1 a favor de Th2 en la infección por *C. pneumoniae*. Se han identificado polimorfismos en el gen CD14 que codifican el receptor celular de alta afinidad para el lipopolisacárido bacteriano (presente en enterobacterias y *Chlamydia*). Este gen está localizado en el cromosoma 5q, adyacente al cluster de genes que codifican las citocinas Th2. Quizá CD14 se relacione con la intensidad de la expresión atópica⁷¹.

La relación entre la infección y el desarrollo del asma estará influenciada por el tipo de organismo, gravedad de la infección y momento en que ocurre lo que lleva a considerar a diversos patógenos como posibles agentes etiológicos de la enfermedad⁴⁶.

Figura 2. Infección respiratoria y asma. Mecanismos inmunológicos. Modificada ref. 67.



2.6. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACION DEL ASMA

Los estudios epidemiológicos sugieren que el asma está infradiagnosticado e infracontrolado, ya que la naturaleza transitoria e inespecífica de los síntomas asmáticos hacen que los pacientes esperen para solicitar opinión médica. No es extraño que un asma sea diagnosticado como una forma de bronquitis y sea tratado inadecuadamente con cursos sucesivos de antibióticos y antitúxicos. Aunque el adagio “no todo lo que pita es asma” es frecuentemente citado, la presencia de sibilancias y broncoespasmo secundarias a un asma subyacente, no diagnosticado, es tan común que sería más apropiado decir que “todo lo que pita es asma hasta que se demuestre lo contrario”³.

2.6.1. Diagnóstico Clínico: síntomas y signos.

El asma presenta una sintomatología característica de episodios de tos, disnea, opresión torácica y sibilantes particularmente durante la noche y primeras horas de la mañana. Pero estos síntomas aunque característicos no son por si mismos diagnósticos. Son marcadores importantes la historia de ataques recurrentes provocados por diversos factores como alergenicos, irritantes, ejercicio e infecciones y el alivio espontáneo de los síntomas con el uso de broncodilatadores y antiinflamatorios. La variabilidad estacional de los síntomas, una historia familiar de asma y presencia de enfermedad atópica son datos que ayudan al diagnóstico³.

El examen físico intercrisis suele ser normal, pero durante las exacerbaciones y dependiendo de su gravedad podemos encontrar los signos típicos de una obstrucción de la vía aérea y aumento del trabajo respiratorio como disnea, sibilantes, espiración prolongada y en crisis graves o prolongadas utilización de músculos accesorios y presencia de pulso paradójico. Los pulmones se hiperdistienden y el diámetro anteroposterior del

torax aumentan observándose la hiperinflación pulmonar en la radiografía de torax. Con frecuencia hay taquicardia, taquipnea y leve hipertensión sistólica. También con frecuencia la tos se hace productiva expulsando un esputo espeso, a veces con la forma cilíndrica de las vías respiratorias (espirales de Curschmann) que a menudo contiene eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden. La existencia de tapones mucosos puede provocar sofocación, desapareciendo incluso las sibilancias, haciendo la respiración entrecortada y necesitando ventilación mecánica. El hallazgo de eosinofilia en el esputo y en la sangre y la determinación de las concentraciones séricas de IgE también son útiles, aunque no específicos de asma³.

2.6.2. Medida de la función pulmonar.

Durante las crisis asmáticas se alteran todas las funciones pulmonares; aumenta la resistencia de las vías aéreas, disminuyen los volúmenes espiratorios forzados y la velocidad de flujo, existe hiperinflación pulmonar y del torax, cambios de la retracción elástica, distribución anormal de la ventilación y flujo sanguíneo pulmonar y alteración de los gases arteriales. La medida de las alteraciones de la función pulmonar proporcionan una valoración indirecta de la hiperreactividad de la vía aérea³. Los dos métodos más empleados para valorar la limitación del flujo aéreo son la medida del volumen espiratorio forzado en un segundo o VEF₁, con el que medimos el volumen de gas espirado durante el primer segundo de la espiración, acompañado del volumen total espirador o la capacidad vital forzada, CVF, y la variabilidad el flujo espiratorio máximo o PEF. Los valores predictivos de VEF₁, CVF y PEF, varían en función de la edad, sexo y peso y han sido obtenidos a partir de estudios poblacionales y sometidos a revisión periódica. La medida de VEF₁ y CVF se realiza durante una maniobra de espiración forzada usando un espirómetro.

Una buena valoración de la limitación del flujo aéreo se puede obtener mediante la relación VEF_1/CVF . La relación normal en adultos es mayor de 0,75 y en niños de 0,85. Cualquier valor por debajo de los referidos sugiere una limitación del flujo aéreo, con valores más bajos a mayor gravedad de la limitación.

La medida del PEF es la que más ayuda al diagnóstico y posterior tratamiento del asma. Con la monitorización del PEF a lo largo del día se puede establecer una línea de base y la variabilidad del flujo aéreo en 24 horas que reflejara la gravedad del asma. Puede realizarse mediante un contador portátil de plástico que permite su uso por el paciente en su domicilio y resulta más económico. El medidor del PEF se correlaciona bien con el FEV_1 , pero son necesarias instrucciones para su uso pues es dependiente del esfuerzo. El método más sensible para describir la variabilidad diaria del PEF es la medida de la amplitud diurna expresada como un porcentaje del valor medio del PEF obtenido a lo largo del día:

$$\text{Variabilidad diaria} = \frac{\text{PEF noche} - \text{PEF mañana}}{\frac{1}{2} (\text{PEF noche} + \text{PEF mañana})} \times 100$$

Lo ideal es realizar la primera medida en la mañana, antes del uso de los broncodilatadores, y la última en la noche tras su inhalación, anotando las mediciones, 2 veces al día durante al menos 1 ó 2 semanas. Una variación diurna o amplitud mayor del 20% es diagnóstica de asma, siendo la magnitud de la variabilidad directamente proporcional con la gravedad de la enfermedad, aunque en el asma leve intermitente o grave puede no existir variabilidad. Además la monitorización del PEF le permite al paciente una detección precoz del inicio de los síntomas, pues cuando se detectan sibilancias por auscultación, el PEF puede haber disminuido más de un 25%³.

También para establecer el diagnóstico, si aún siguen existiendo dudas, se puede ensayar un tratamiento con broncodilatadores de acción corta y corticoides además de la monitorización del PEF³.

2.6.3. Medida del estado alérgico.

Los test cutáneos con alérgenos representan la primera herramienta diagnóstica en alergia. Son fáciles de realizar y muy sensibles pero su especificidad es menor y un positivo no significa necesariamente que la enfermedad es de naturaleza alérgica. La medida de IgE específica en suero tiene valor pero no supera a las pruebas cutáneas y es más cara. La medida de IgE total o IgG₄ específica de alérgeno en suero tampoco tiene mayor valor en el diagnóstico de alergia. La presencia de un componente alérgico puede ayudar a identificar factores de riesgo, causales y “triggers”, pero la relación entre la exposición al agente y los síntomas debe ser confirmada con la historia clínica³.

2.6.4. Diagnóstico diferencial.

Los grupos con mayor dificultad para el diagnóstico de asma son los menores de 5 años y los adultos mayores. Las causas alternativas de episodios repetidos de broncoespasmo y sibilancias en la infancia son la fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, inmunodeficiencias primarias, enfermedades congénitas del corazón, malformaciones de la vía respiratoria, regurgitaciones repetidas de leche, aspiración de cuerpos extraños o episodios de broncoespasmo asociado a infecciones respiratorias virales y bronquiolitis sin existencia de atopia ni anomalías subyacentes y sin posterior desarrollo de asma. En pacientes mayores se superponen los efectos de la inhalación del

humo del tabaco durante la vida, las enfermedades bronquíticas crónicas y el enfisema, síndromes vasculíticos con eosinofilia como la enfermedad de Churg Strauss y los episodios de tos y disnea causados por la insuficiencia cardiaca izquierda³.

Existen variedades de asma que pueden dificultar su diagnóstico inicial como el asma ocupacional, que ocurre en presencia de sustancias químicas sin que el paciente en un inicio pueda ser consciente, el asma estacional intermitente y relacionado con la rinitis alérgica y la variedad tusígena³ que principalmente se manifiesta con tos y aparente normalidad de los índices de función pulmonar.

Los enfermos en tratamiento antihipertensivo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, individuos con reflujo gastroesofágico, goteo postnasal o sinusitis crónica pueden desarrollar tos y recordar a la variedad tusígena del asma.

El paso más importante a la hora de demostrar la presencia de enfermedad asmática es la demostración con espirometría de la variabilidad y reversibilidad de la limitación del flujo aéreo.

2.6.5. Clasificación del asma.

El asma puede ser clasificado, como veremos a continuación en función de su etiología, gravedad y patrón de limitación del flujo aéreo³.

2.6.5.1. Etiología.

Se ha intentado clasificar el asma en función de su etiología y en función del estímulo iniciador o desencadenante de agudizaciones. Se podría hablar de un asma alérgica o *extrínseca*, cuando se conoce el estímulo desencadenante de una respuesta

atópica, e idiosincrásica o *intrínseca* si no existe historial de alergias ni se conoce el estímulo ambiental. Pero existen estímulos, aún por identificar, que desencadenan mecanismos celulares e inmunológicos distintos a la respuesta de IgE y que no dependen de la hipersensibilidad inmediata. La asociación encontrada entre las concentraciones de IgE en suero y el asma en todos los grupos de edad, incluyendo individuos no atópicos, aumenta la posibilidad de que la respuesta inflamatoria inicial sea desencadenada en todas las formas de la enfermedad por el entorno medioambiental u otros antígenos⁷².

2.6.5.2. Gravedad.

La combinación de la medida de la función pulmonar y la sintomatología presente permite una caracterización útil de la enfermedad asmática. Según la limitación del flujo aéreo y la variabilidad presente, el asma se subdivide en *intermitente*, *persistente leve*, *persistente moderado* y *persistente grave*⁷³. Esta clasificación permite un mejor manejo y ajuste escalonado del tratamiento farmacológico (tabla 2).

Es importante saber que cualquier paciente con asma leve o grave puede tener una exacerbación que debe ser reconocida y tratada adecuada y precozmente pues tales exacerbaciones pueden ser fatales. Existen factores específicos que ayudan a identificar las crisis de mayor riesgo de mortalidad como son una historia previa de crisis graves, o intubación por asma, hospitalización en el último año, reducción reciente o cese de la terapia con corticosteroides, problemas psicosociales y enfermos no cumplidores del tratamiento.

Tabla 2. Clasificación de la gravedad del asma. Modificada de ref. 3.

	Síntomas	Función pulmonar	Tratamiento de control
Persistente grave	-Síntomas continuos -Frecuentes agudizaciones -Actividad física limitada -Síntomas nocturnos frecuentes	-PEF o FEV ₁ *≤60% previsto *variabilidad >30%	-Corticoides inhalados a altas dosis y orales diarios -Broncodilatadores (BD) de acción larga diarios
Persistente moderada	-Síntomas diarios -Exacerbaciones que afectan a la actividad -Síntomas nocturnos más de 1 vez por semana	-PEF o FEV ₁ *>60% -<=80% previsto *variabilidad >30%	-Agonistas-B ₂ inhalados de acción corta diarios -Corticoides inhalados diarios -BD de acción larga especialmente nocturnos
Persistente leve	-Síntomas <1 vez/día, >2 veces/semana -Pueden alterar la actividad -Síntomas nocturnos más de 2 veces al mes	-PEF o FEV ₁ *>=80% previsto *variabilidad 20%-30%	-Antiinflamatorios +/- -BD de acción larga (sobre todo nocturnos)
Intermitente	-Síntomas≤2veces/semana -Agudizaciones breves y de intensidad variable -Síntomas nocturnos <2 al mes.	-PEF oFEV ₁ *>80% previsto *variabilidad <20% PEF normal intercrisis	-Sólo ante la presencia de síntomas: agonistas B2 de acción corta -Corticoides orales según la intensidad de la crisis

2.6.5.3. Limitación del flujo aéreo.

El asma puede también ser clasificado en función de la medición y monitorización del PEF³. De esta forma el *asma intermitente* se define como la presencia ocasional de síntomas asmáticos y reducciones del PEF en el último año, con PEF normal o reactividad casi normal entre episodios, en contraste del *asma persistente* caracterizado por variabilidad diaria y nocturna, síntomas frecuentes e hiperreactividad. Se usa el término “*brittle asthma*” para describir pacientes con asma persistente grave, extrema variabilidad diaria difícil de controlar con la medicación e importante riesgo de exacerbaciones repentinas que comprometen la vida.

2.6.6. Reagudización del asma.

Las exacerbaciones asmáticas son episodios de disnea con empeoramiento progresivo, tos, sibilancias u opresión torácica, o la combinación de estos síntomas. Es común que exista distress respiratorio. La crisis asmática se caracteriza por disminución del PEF o FEV₁, cuya medida nos indica la gravedad de la limitación del flujo aéreo en la crisis³.

Las exacerbaciones son reflejo de una exposición a un “trigger” o el fallo en las medidas de control. La gravedad de la crisis puede ser leve o comprometer la vida y el deterioro progresar en horas o días, pero también puede precipitarse en minutos. Cuando hay una reexposición al antígeno específico los mastocitos secretan sustancias activas que dan lugar a todo el proceso inflamatorio y de limitación del flujo aéreo.

Dada la diversidad de antígenos provocadores, sólo podemos explicar la etiología de la hiperreactividad bronquial bajo un concepto multifactorial, y como consecuencia de

reacciones hísticas anormales de origen inmunológico o de un desequilibrio bioquímico o neurohormonal.

La morbilidad y mortalidad de las crisis asmáticas dependen de la gravedad y de la adopción de medidas terapéuticas precoces y adecuadas. La primera línea de ataque viene con la administración repetida de broncodilatadores de acción, corta como los agonistas beta₂-adrenérgicos y la administración precoz de corticosteroides inhalados o por vía parenteral, si es necesario, además de la oxigenoterapia.

El uso de antibióticos en las exacerbaciones sigue los mismos criterios que en los no asmáticos y aún no está claro el beneficio de la adición empírica de un antibiótico al tratamiento empírico de la crisis asmática.

2.7. TRATAMIENTO DEL ASMA.

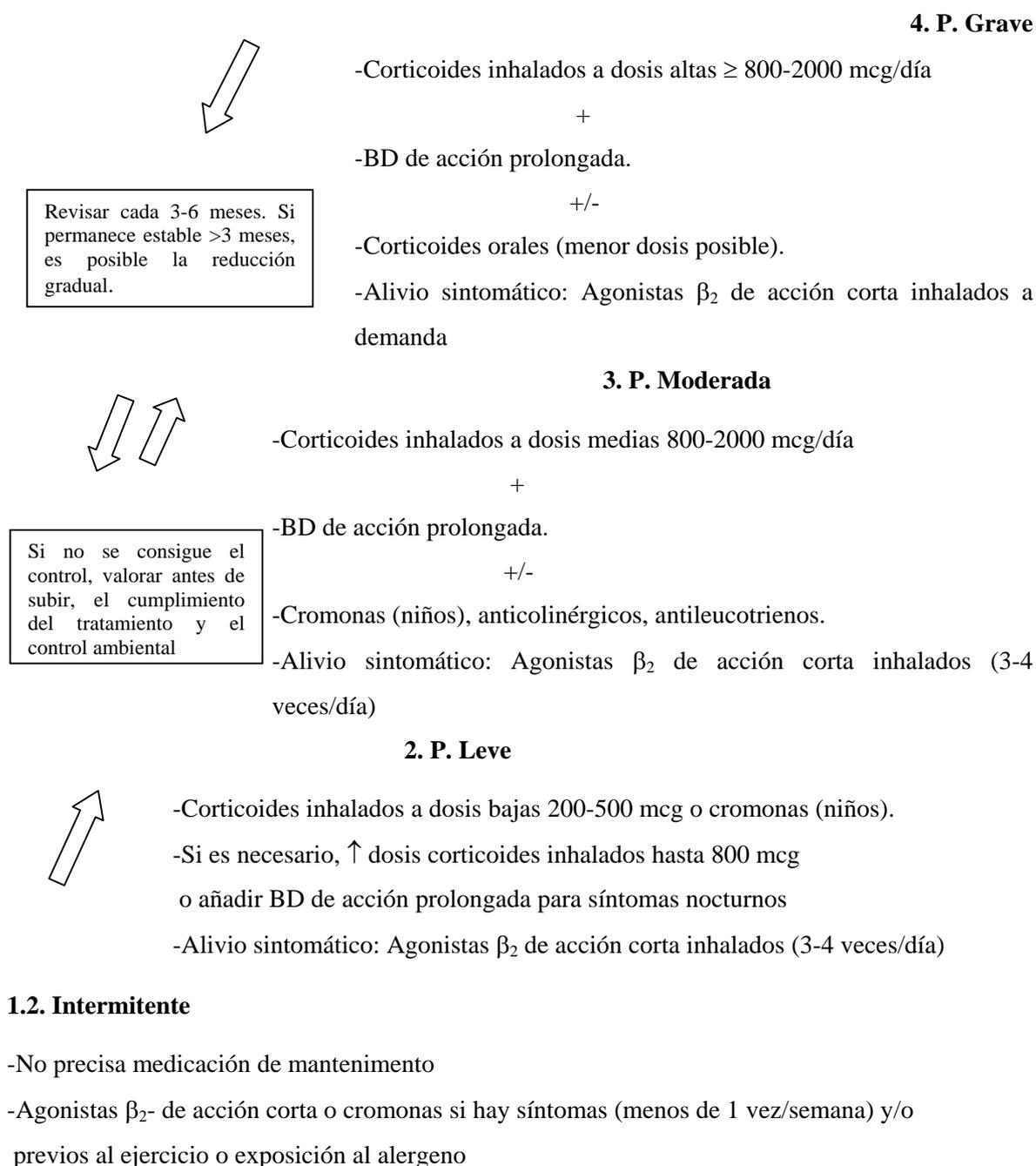
Los objetivos del tratamiento son: i) mejorar la calidad de vida, ii) disminuir la sintomatología crónica, iii) prevenir las exacerbaciones, iv) mantener la función pulmonar normal o lo más cercana a la normalidad posible y v) prevenir los efectos adversos de la medicación.

El tratamiento del asma presenta dos vertientes: a) la etiológica, evitando la exposición a los alérgenos sensibilizantes como ácaros, animales, tabaco, polen, alérgenos profesionales o mediante inmunoterapia, y b) la paliativa o sintomática con fármacos antiinflamatorios y broncodilatadores además de la terapia adicional para las crisis agudas con/sin antibióticos (tabla 3). Ninguno es eficaz por sí sólo para todos los procesos patológicos y lo habitual es utilizar regímenes con varios fármacos siguiendo una selección escalonada según la gravedad del asma^{3,74} (figura 3). El mejor tratamiento es el dirigido a disminuir la inflamación y son los corticoides inhalados los fármacos más eficaces en el control de los síntomas, pero su empleo prolongado sigue siendo un aspecto controvertido

debido a sus efectos secundarios. El tratamiento broncodilatador es meramente paliativo y no debe utilizarse sólo como tratamiento de fondo. La inmunoterapia debe utilizarse en casos muy seleccionados con una sensibilidad muy manifiesta a un alérgeno y raramente se utiliza en menores de 5 años⁷⁵. El uso de nuevos inmunosupresores puede ayudar a los glucocorticoides al control de la cascada de citocinas. Entre estos nuevos agentes se encuentran el micofenolato de mofetilo, supresores endógenos de los linfocitos Th2, inhibidores de la fosodiesterasa 4 e inhibidores específicos de citocinas⁷⁶.

Tabla 3. Fármacos empleados en el tratamiento del asma.

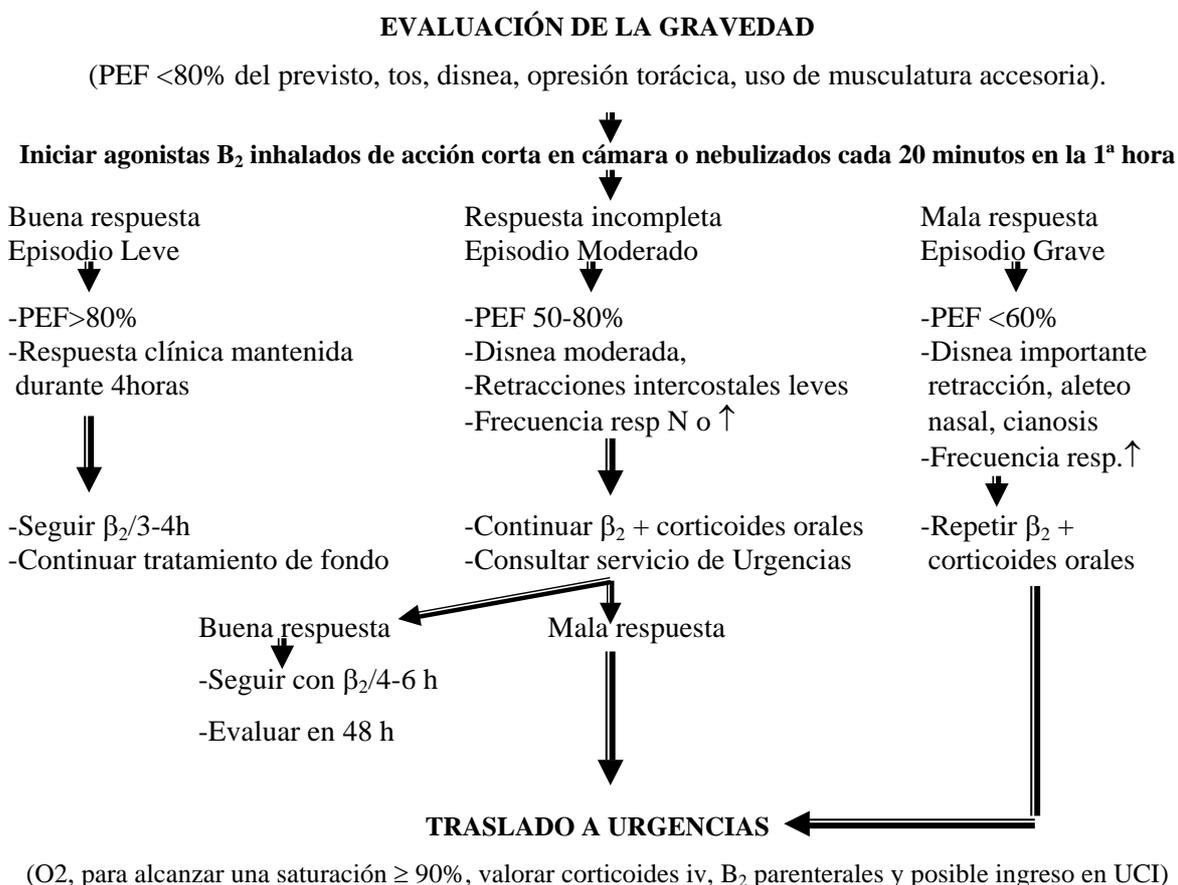
<p>Tratamiento de las crisis: Relajación rápida del músculo liso bronquial.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Agonistas Beta-2 adrenérgicos de acción corta (broncodilatadores más potentes): salbutamol, terbutalina -Anticolinérgicos (niños < 2 años): bromuro de ipatropio <p>Tratamiento de fondo antiinflamatorio: Disminución de la reactividad bronquial e inflamación mucosa</p> <ul style="list-style-type: none"> -Corticoides inhalados (medicación inhalada más potente): beclometasona, budesonida, fluticasona -Cromonas (niños y asma inducido por ejercicio o alérgenos conocidos): nedocromil sodico, cromoglicato disódico -Corticoides sistémicos (pautas cortas en crisis y continuado en asma grave): prednisona, hidrocortisona, prednisólona, metilprednisólona <p>Tratamiento adicional a los corticoides inhalados (especialmente para el control de síntomas nocturnos)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Broncodilatadores de acción prolongada: salmeterol, formoterol -Metilxantinas (asma crónico grave, necesitan monitorización): teofilinas -Antileucotrienos (asma persistente leve y moderado): montelukast, zafirlukast -Antihistamínicos (prevención de asma en niños atópicos): ketotifeno
--

Figura 3. Tratamiento escalonado de mantenimiento en el asma. Modificada ref. 3.

El tratamiento de las agudizaciones depende de la gravedad de la crisis y varía según la respuesta al tratamiento inicial^{3,74} (figura 4). En las agudizaciones leves, detectadas por el aumento de los síntomas y disminución del PEF, se duplicará la dosis de corticoides inhalados hasta la desaparición de los síntomas. Cuando existe un aumento importante de los síntomas y descenso acentuado del PEF son necesarios los ciclos cortos de corticoides.

A pesar de la controversia respecto al papel de las bacterias en el desarrollo de la enfermedad, hay autores que sugieren la inmunoterapia con vacunas de extractos bacterianos para prevenir el efecto de los antígenos bacterianos en la reagudización⁷⁷. Otros autores plantean que el tratamiento con antibióticos activos frente a *C. pneumoniae* puede dar lugar a mejoría sintomática y remisiones prolongadas pero aún no se ha comprobado en beneficio de la inclusión de antibióticos específicos en el tratamiento empírico inicial de los pacientes con asma y seropositivos para *Chlamydia*.

Figura 4. Manejo de la crisis asmática.



3. CHLAMYDIA PNEUMONIAE.

3.1. CHLAMYDIA PNEUMONIAE. ANTECEDENTES.

Chlamydia pneumoniae es un patógeno intracelular que causa infecciones agudas del tracto respiratorio, incluyendo neumonía, bronquitis, sinusitis y faringitis. También se le ha asociado con arteriosclerosis y otros procesos extrapulmonares.

El organismo fue aislado en 1965 de la conjuntiva de un niño taiwanés durante el ensayo de una vacuna para el tracoma⁷⁸. La cepa se cultivó en el saco vitelino de un embrión de pollo y recibió el nombre de TW-183. En posteriores cultivos celulares se observaron la presencia de inclusiones celulares densas, redondas y similares a las descritas para *C. psittaci*. En 1968 también se aisló en la conjuntiva de un niño iraní un microorganismo cultivado en embrión de pollo (IOL-207) posteriormente identificado como *C. pneumoniae*⁷⁹. A pesar de la fuente conjuntival de estos dos aislados, el organismo no ha sido relacionado con enfermedad ocular.

El papel de *C. pneumoniae* como patógeno respiratorio no fue definido hasta 1983, cuando se consiguió el primer aislado respiratorio (AR-39) en el lavado faríngeo de un estudiante de Seattle con faringitis, antigénicamente asociada con TW-183⁸⁰. En 1985 se publicaron series de datos serológicos que suponían la asociación del microorganismo con neumonía, pasando a llamarse TWAR⁸¹.

En 1989, tras análisis ultraestructurales y de homología del DNA, TWAR fue reconocida por Grayston como una nueva especie llamada *C. pneumoniae*⁸².

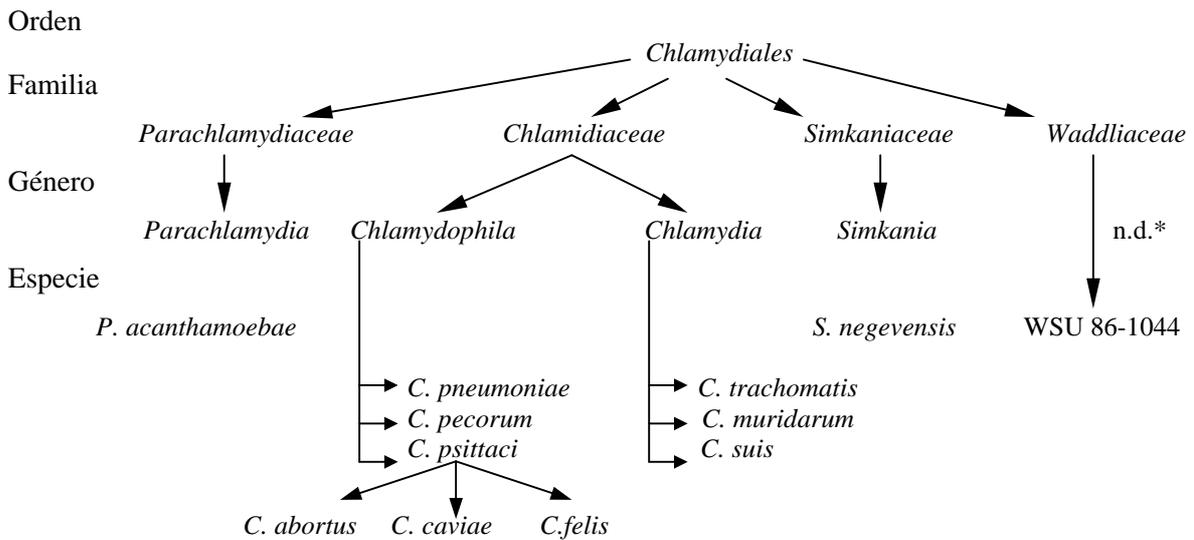
Se considera a *C. pneumoniae* causante de una media del 10% de las neumonías adquiridas en la comunidad, y de un 5% de la bronquitis y sinusitis. La infección primaria

es más frecuente entre los 5-10 años y la mayoría de los adultos tienen evidencias serológicas de infección pasada. La mayoría de los estudios serológicos se han realizado con test de microinmunofluorescencia específica y recientemente se han introducido para su detección las técnicas moleculares como la PCR.

3.2. MICROBIOLOGÍA DE *C. PNEUMONIAE*.

Se ha propuesto recientemente una reclasificación del orden de los *Chlamydiales* tras el análisis filogenético del RNAr 23S y 16S, el cual ha aportado nueva información genética y fenotípica. Los *Chlamydiales* se dividen al menos en cuatro familias, entre ellas *Chlamydiaceae* que contiene dos géneros, *Chlamydophila gen.nov.* y *Chlamydia gen.nov.*, y nueve especies^{83,84} (figura 5). Previamente solo se consideraba la existencia del género *Chlamydia* en el que se incluían todas las especies conocidas de clamidias. Ahora *Chlamydia pneumoniae* pertenece al género *Chlamydophila*, y taxonómicamente recibe el nombre de *Chlamydophila pneumoniae comb.nov.*, aunque todavía se admite el uso de la denominación de anterior. Cuando nos estemos refiriendo a *C. pneumoniae* los haremos a su denominación como *Chlamydophila pneumoniae*, aunque emplearemos el término *Chlamydia* de forma genérica para mayor comodidad.

La clasificación taxonómica clásica de *Chlamydia* está basada en criterios fenotípicos, morfológicos y genéticos. Todas las especies de la familia *Chlamydiaceae* son reconocidas por anticuerpos monoclonales (mAbs) que detectan el epitopo trisacárido del lipopolisacárido $\alpha Kdo-(2\rightarrow 8)-\alpha Kdo-(2\rightarrow 4)-\alpha Kdo$ ⁸³. El grado de relación genética entre todos los aislados de *C. pneumoniae* estudiados es >95% y del 10% con *C. psittaci*⁸⁵. Se ha hallado un plásmido de *C. pneumoniae* en un aislado de caballo de *C. pecorum*.

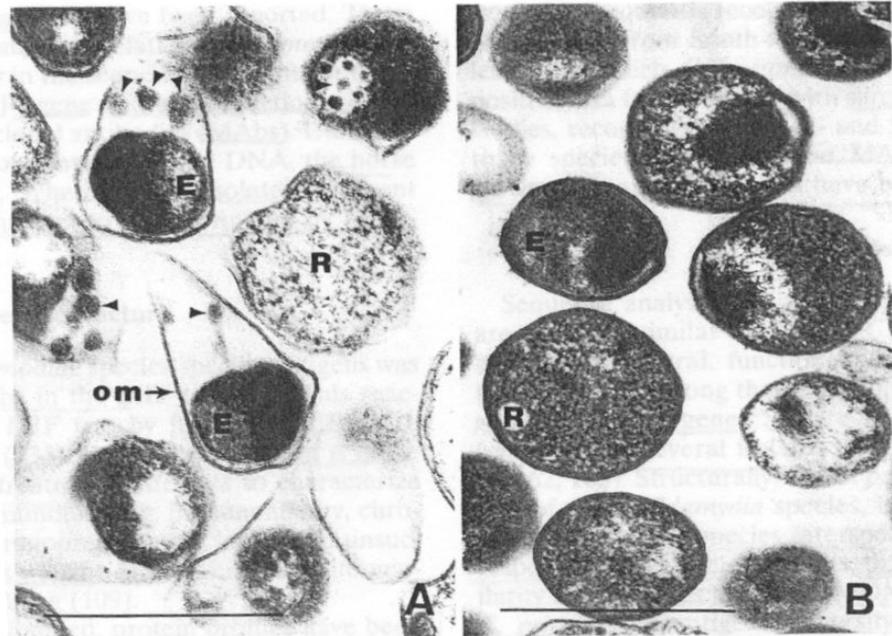
Figura 5. Nueva clasificación filogenética de la familia *Chlamydiaceae*.

*n.d. no denominada

La pared celular de *Chlamydia* se asemeja a la de las bacterias gramnegativas y se reproducen por fisión binaria, por lo que se les ha clasificado como bacterias. Son parásitos energéticos ya que utilizan el ATP de la célula huésped para la síntesis de sus proteínas.

Las especies de *Chlamydiaceae* son parásitos intracelulares obligados de las células eucarióticas con dos formas de vida distintas: el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticulado (CR). Dada la importancia de la existencia de estas dos formas en la patogenia de la enfermedad las explicaremos detalladamente en la sección de inmunología y patogenia. Se ha visto por microscopía electrónica que el CE de *C. pneumoniae* tiene una forma piriforme característica, a diferencia de los CEs de *C. trachomatis*, *C. psittaci* o *C. pecorum* de forma redondeada (figura 6). Los CEs están rodeados de un espacio periplásmico que también es morfológicamente distinto en *C. pneumoniae*. Se han visto aislados de *C. pneumoniae* con CEs redondos, pero el análisis molecular es similar a otras especies de *C. pneumoniae*⁸⁶. El significado de estas diferencias morfológicas no se conoce.

Figura 6. Microfotografía electrónica de *C. pneumoniae* (A) y *C. trachomatis* (B). Tomada de ref. 86.



E: Cuerpo elemental; R: Cuerpo reticulado; om: membrana externa. Las puntas de flecha indican pequeños cuerpos electrodensos. Barra = 0,5 μ m.

3.3. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE CHLAMYDIA, GENÉTICA Y BIOLOGÍA.

Este es uno de los aspectos menos conocidos. Todas las especies presentan un antígeno común, asociado a la membrana celular y específico de género, el antígeno lipopolisacárido (LPS) que es común a las tres especies y tiene actividad de endotoxina. Los anticuerpos frente a este antígeno son los primeros en aparecer ante una infección aguda tanto primaria como secundaria.

En la membrana externa de *Chlamydia* y *Chlamydophila* se encuentra el complejo proteico de la proteína mayor de membrana externa (MOMP) que contiene los antígenos específicos de especie. La caracterización de estos antígenos sólo se ha conseguido

mediante microinmunofluorescencia con Mabs, ya que son antígenos muy lábiles a los métodos físicos y químicos habituales⁸⁶.

Se han identificado por inmunoprecipitación otras proteínas de diferente peso molecular y análogas entre las tres especies. Sin embargo existe una proteína rica en cisteína de 98 kDa que sólo aparece en la membrana externa de *C. pneumoniae* y que parece proporcionar rigidez a la estructura y favorecer la morfología piriforme del CE. En los aislados de *C. pneumoniae* con CE redondeados, la concentración de esta proteína está disminuida. Se ha visto la presencia de anticuerpos contra esta proteína tras la primoinfección⁸⁷.

En el suero de pacientes con sarcoidosis y arteriosclerosis se ha reconocido la presencia de proteínas específicas de *C. pneumoniae*⁸⁸.

3.3.1. Genética.

Se han identificado en *C. pneumoniae* genes análogos a otros en *C. trachomatis* y *C. psittaci* que codifican proteínas estructurales, funcional e inmunológicamente importantes. Estos genes son *ompA*, *ompB*, *groEL* y *DnaK*⁸⁶.

Omp A codifica proteínas de MOMP presentando gran homogeneidad genética entre distintos aislados de *C. pneumoniae*. En cambio la diversidad genética es mayor en *C. psittaci* y *C. trachomatis* por la existencia de dominios variables en estas especies.

Omp B codifica una proteína de 60-kDa rica en residuos de cisteína, altamente conservados entre especies y con probable función estructural.

GroEL y DnaK codifican las *heat shock proteins* o HSPs, proteínas con un importante papel en la inmunopatología de la infección. La HSP de 60 kDa (GroEL) de *C. trachomatis* se ha asociado con la respuesta de hipersensibilidad retardada en infecciones

crónicas. En contraste los anticuerpos contra la HSP 70 kDa (DnaK) tienen actividad neutralizante. Ambas proteínas están presentes en el suero de pacientes con serología positiva a *C. pneumoniae*. El gen GroEL de *C. pneumoniae* tiene un 95 y 97% de homología con el gen GroEL de *C. trachomatis* y *C. psittaci*, respectivamente. El gen DnaK de *C. pneumoniae* presenta un 87% de similitud con *C. trachomatis*.

El gen Dnak también codifica la HSP 76 kDa, primer antígeno específico de *C. pneumoniae* que se ha conseguido identificar⁸⁹. Se ha conseguido neutralizar la infección en cultivos celulares mediante suero de conejo hiperinmune dirigido contra este antígeno.

3.4. EPIDEMIOLOGÍA.

C. pneumoniae es considerado un patógeno humano y no se le conoce reservorio animal. Aunque ha sido reconocida como patógeno respiratorio en 1983, exámenes realizados en muestras congeladas revelan que es una causa frecuente de infección desde 1963⁹⁰.

3.4.1. Transmision.

La transmisión parece ser relativamente ineficiente. En el estudio seroepidemiológico, realizado por Aldous y cols⁹⁰, con 68 familias durante el periodo 1966-1979 para determinar la incidencia de infección aguda en las familias de Seattle, en todos los episodios de infección múltiple hubo miembros de las familias sin evidencia de infección. También fue relativamente frecuente la falta de infecciones secundarias familiares, lo que sugiere que la diseminación del organismo no es fácil y quizá sólo unas pocas personas infectadas transmitan la bacteria.

C. pneumoniae sobrevive en pequeños aerosoles a temperatura ambiente y en condiciones de alta humedad relativa durante un tiempo relativamente corto en el que la transmisión persona a persona es posible especialmente en situaciones de hacinamiento⁹¹. No obstante se aceptan tres mecanismos posibles de transmisión: i) aerosoles de pequeñas partículas (<10 µm), ii) inoculación directa por gotas o partículas grandes y iii) a través de fomites y superficies contaminadas⁹².

El microorganismo puede permanecer viable bastantes horas sobre superficies como la fórmica y el papel donde permanece hasta 30 horas y 12 horas respectivamente. También es posible la transmisión a las manos desde esas superficies aunque el inóculo transmitido es escaso y la supervivencia se limita a 15 minutos⁹². El portador asintomático y la excreción prolongada del microorganismo (hasta superior a un año) favorecen la transmisión⁹³. Se han descrito epidemias en cuarteles⁹⁴ y se ha aislado *C. pneumoniae* en la faringe de hasta un 5% de la población sana⁹⁵ y un 6% de los niños⁹⁶. No existe evidencia de transmisión sexual de *C. pneumoniae*⁹⁷.

3.4.2. Distribución por edades y sexo.

La infección por *C. pneumoniae* presenta una distribución bimodal y aumenta con la edad, siendo rara en niños menores de 5 años y mostrando un pico de incidencia a los 8-9 años y otro a los 70 años⁹⁸, diferenciándose de *C. trachomatis* cuya la infección en estos grupos edad no es común predominando en edades muy prematuras, adolescente mayores y adultos jóvenes. En torno a los 20 años el 50% de las personas tienen anticuerpos detectables, y continúa aumentando de forma más lenta que en la infancia hasta alcanzar el 75% en la población anciana. Estas prevalencias existen a pesar de que la primoinfección induce una respuesta de anticuerpos limitada en el tiempo (3-5 años), sugiriendo que la mayoría de las personas sufren reinfecciones a lo largo de su vida⁸⁶. El título de

anticuerpos tras la reinfección permanece más tiempo que tras la infección primaria.

Grayston⁹⁸ estudió 2000 sueros pareados, clasificados por años, edad y sexo procedentes de enfermos de neumonía durante los años 1963-1975. El 8% presentaba serología compatible con infección aguda con una tasa de incidencia de 1/1000 casos por año que aumentaba a 3/1000 casos por año en los sujetos de 70 años.

La seroprevalencia es aproximadamente igual por debajo de los 15 años en ambos sexos, pero a partir de los 20 años disminuye en la mujer⁹⁹ excediendo la seroprevalencia del hombre en un 25%¹⁰⁰ y manteniéndose estas diferencias en todos los países sin que aún se conozca la causa, aunque se ha querido relacionar con el hábito de fumador más común en el hombre, ya que la prevalencia y títulos de anticuerpos parecen más elevados tanto en el grupo masculino como en los fumadores¹⁰¹.

3.4.3. Distribución global de la prevalencia y periodicidad.

La respuesta serológica ante la infección por *C. pneumoniae* puede alterarse debido a diferencias en el inóculo, infección previa o reacciones cruzadas con otras especies. Por esta razón los datos serológicos están sujetos a una importante variabilidad. Aunque la seroprevalencia mundial de inmunoglobulina G (IgG) positiva para *C. pneumoniae* oscila entre un 50% y un 60%, y la infección por *C. pneumoniae* está ampliamente distribuida, existen diferencias entre distintos países y distintas regiones¹⁰², siendo los países tropicales los que muestran la prevalencia más alta (70%)^{86,103}. En Taiwan es del 23%, 67 y 96% en niños, adolescentes y adultos respectivamente¹⁰⁴. En Alemania la seroprevalencia de IgG alcanzó 65% en estudiantes¹⁰⁵.

En un estudio de prevalencia realizado en España entre niños y jóvenes del País Vasco se hallaron datos de infección por *C. pneumoniae* en más del 40% de los niños mayores de 7 años¹⁰⁶.

En torno al 10% de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) son a causa de *C. pneumoniae*^{101,107,108,109}. La mayoría son tratadas fuera del hospital, lo que puede infravalorar su incidencia. En España un estudio multicéntrico de Almirall y cols¹¹⁰. en Cataluña encontró a *C. pneumoniae* como el agente etiológico de neumonía adquirida en la comunidad más frecuente con una proporción del 15.3%. En otro estudio similar en Italia se obtuvo un porcentaje de incidencia del 13%¹¹¹. Gómez y cols¹¹². llevaron a cabo un estudio con 342 pacientes diagnosticados de NAC en el que establecen el diagnóstico microbiológico en 100 casos. *Streptococcus pneumoniae* y *C. pneumoniae* fueron los microorganismos más frecuentes (43% y 21%). En otro estudio de Torres y cols¹¹³., realizado en pacientes con bronquitis crónica obstructiva (BNCO) y NAC, se encontró a *C. pneumoniae* como el segundo agente etiológico (12%) tras *S.pneumoniae*. Se han realizado otros trabajos de incidencia de la infección en España con resultados variables^{114,115,116}. En conjunto se estima que en nuestro país, *C. pneumoniae* es la causa del 12%-21% de las NAC¹¹⁷.

La infección presenta carácter endémico y epidémico con cambios cíclicos en su incidencia alternando periodos de alta incidencia seguidos de periodos de baja. La primera epidemia ocurrida en Escandinavia¹¹⁸ fue atribuida en un principio a *C.psittaci*, al asemejarse el cuadro clínico con la ornitosis. Un seguimiento en Finlandia durante varios años de la seroprevalencia de IgG demostró la presencia de ciclos de aproximadamente 10 años con cifras que variaban entre un 44% y un 66%¹¹⁹. Otro estudio retrospectivo de Grayston con sueros recogidos de pacientes con neumonía entre 1963-1975 se observó la presencia de ciclos de 4 años sin periodicidad estacional¹²⁰.

Con relativa frecuencia la infección por *C. pneumoniae* se asocia a otros patógenos que causan enfermedad. Se han descrito infecciones mixtas con *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, virus respiratorio sincitial, adenovirus y parainfluenza y en

especial con *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, lo que puede agravar el cuadro clínico^{55,103,113}. Esta asociación es más frecuente en sujetos con patologías de base como malnutridos, alcohólicos, bronquíticos crónicos y ancianos y en las formas nosocomiales^{121,122}. La frecuencia de infecciones mixtas se estima en torno al 40%^{110,121}. La identificación de un germen no excluye la presencia de otro, indicando la importancia de un diagnóstico precoz ya que el tratamiento contra el neumococo puede no ser eficaz frente a *C. pneumoniae*.

3.4.4. Modelos animales.

La inoculación intranasal en cobayas produce un infiltrado pulmonar con imagen de neumonitis intersticial y la aparición de IgG. Al principio de la infección predominan los leucocitos polimorfonucleares y posteriormente los mononucleares. Se aísla *C. pneumoniae* en el pulmón del animal hasta un mes después de la inoculación⁸⁶.

3.5. INMUNOLOGIA Y PATOGÉNESIS.

Las especies de la familia *Chlamydiaceae* infectan de forma específica a diferentes células dependiendo del inmunotipo (serovar) y la composición antigénica de cada una. A su vez cada inmunotipo tiene su propia patogenicidad (biovar). *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* son patógenos exclusivamente en humanos, mientras que *Chlamydia psittaci* produce infecciones intestinales y pulmonares en pájaros aunque sus excreciones son también infecciosas para el hombre. *C. pecorum* infecta a caballos, ganado vacuno y bóvidos pero también puede afectar al hombre. Las infecciones en mamíferos inferiores son muy variadas dejando secuelas crónicas relacionadas con su antigenicidad.

La infección por especies de *Chlamydia* o *Chlamydophila* induce una significativa respuesta inflamatoria a nivel celular, un importante aflujo de linfocitos, macrófagos, y células plasmáticas, como ocurre en la infección genital por *C. trachomatis*. Existe una respuesta humoral con anticuerpos IgG, IgM e IgA y se ha observado en cultivo celular la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos de *C. pneumoniae*, aunque aún no se conoce cual es su papel en la respuesta inmunitaria contra esta bacteria.

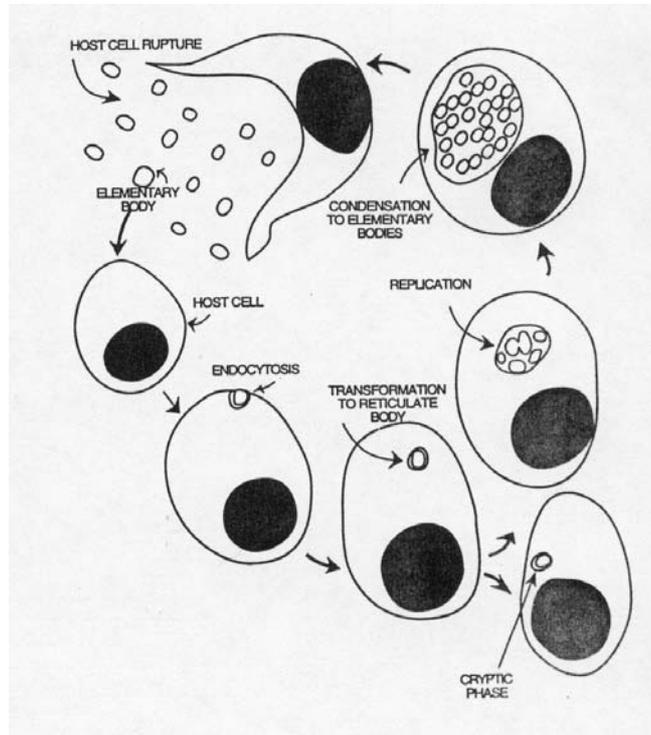
La infección por alguna de las especies parece difícil de erradicar tras su establecimiento en el huésped. Es el caso de *C. trachomatis* que produce una infección del tejido ocular durante la infancia, el tracoma, pero sus complicaciones y retracciones oculares no suelen ser evidentes antes de los 40 años. Mientras los individuos parecen estar protegidos de la infección recurrente a pesar de la exposición repetida. Esto llevo hace 30 años a realizar ensayos de vacunación en los que se observó que cualquier protección inducida era corta y tipoespecífica, pero que las reacciones de hipersensibilidad eran de larga duración y grupo específicas. *C. trachomatis* puede ser caracterizado como un organismo ampliamente prevalente a través de sus procesos crónicos que da lugar a una respuesta inmune aberrante a la infección. Quizá ocurra lo mismo con *C. pneumoniae*, pero es necesario examinar su ciclo vital para que estas características pueden ser apreciadas¹²³.

3.5.1. Ciclo vital de *Chlamydia*.

El desarrollo de *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* y *C. pecorum* sigue un curso bifásico a nivel intracelular alternando formas de vida morfológica y funcionalmente distintas (figura 7): 1) una forma intracelular que puede presentar actividad metabólica y replicativa conocida como cuerpo reticulado (CR) o bien existir como un organismo latente y no replicativo conocido como cuerpo críptico y 2) una forma de vida extracelular

metabólicamente inactiva, pero con capacidad infecciosa llamada cuerpo elemental (CE)^{86,123}.

Figura 7. Ciclo vital de *Chlamydia*. Tomada de ref. 123.



Los CEs son de pequeño tamaño (300-400 nm), semejantes a una espora, sin actividad metabólica ni replicativa y resistentes a agresiones físicas externas. El CE también es capaz de resistir la acción oxidante del medio extracelular y de sobrevivir largo tiempo fuera de la célula huésped, pudiendo ser transmitido a nuevos huéspedes en forma de gotitas o a través de fomites⁸⁶. En la membrana del CE se encuentra el MOMP, complejo proteico relacionado con la unión celular, la estabilidad física del CE y con antígenos específicos de especie.

Los CEs penetran dentro de la célula huésped mediante un proceso de endocitosis específico del parásito cuyo mecanismo aún se desconoce¹²³. Los CEs de *C. pneumoniae* contactan a través de un extremo punteado y forman una protuberancia en la pared celular para pasar al interior mediante endocitosis. Se forman así vacuolas o endosomas que

interceptan las vesículas que transportan lípidos y esfingolípidos desde el Aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, secuestrándolos para su propio uso metabólico y la renovación de la membrana del endosoma. La endocitosis parece requerir el citoesqueleto funcional de la célula huésped, pues la adición de citocalasina, un inhibidor de microfilamentos celulares, inhibe también el proceso de endocitosis clamidial^{86,123}.

A los pocos minutos de la endocitosis se puede detectar la presencia de RNAm. El CE se transforma rápidamente en CR de mayor tamaño (500-1000 nm) pleomórfico, metabólicamente activo y que se replica por fisión binaria formando los característicos cuerpos de inclusión citoplásmicos. El CR requiere del ATP y nutrientes celulares para su metabolismo y replicación, ya que no posee los mecanismos de glicolisis aerobia y es incapaz de sintetizar nuevo nucleótidos. Esta dependencia lleva a disminuir el rendimiento energético de la célula huésped y a un proceso de parada en sus propios mecanismos de biosíntesis. Una alta tasa de replicación clamidial promueve una rápida división de la célula huésped, mientras que tasas bajas de replicación enlentecen la división celular.

A medida que el CR se multiplica también se produce su condensación que dará lugar al CE. En 2 a 4 días tras la endocitosis se produce la lisis celular y la suelta de los nuevos CEs al medio extracelular.

3.5.2. Factores inmunopatológicos de las infecciones por *Chlamydia*.

Tras la lisis se produce la diseminación sistémica de *Chlamydia* a distintos lugares donde puede permanecer en forma de infección latente. Esto ha dado lugar a especulaciones sobre la posible relación con enfermedades autoinmunes¹²⁴.

3.5.2.1. Infección de los monocitos y macrófagos.

El primer factor inmunopatológico es la capacidad para infectar a los monocitos y macrófagos, replicarse en su interior y resistir la acción de los ácidos producidos en la vacuola fagocítica así como de las enzimas hidrolíticas. La mayoría de los microorganismos que no son eliminados por la fagocitosis y por lo tanto son capaces de resistir el metabolismo oxidativo, manifiestan una respuesta adaptativa al estrés oxidativo mediante la detoxificación de los reactivos intermediarios y componentes celulares dañados, contribuyendo así a su propia supervivencia. Esta respuesta está regulada por el factor oxyR, aumentando su transcripción, y es genéticamente inducible. En algunos patógenos intracelulares como el *Mycobacterium tuberculosis* esta respuesta es constitutiva y el factor oxyR está inactivado.

La mayoría de las bacterias también disponen de proteínas reparadoras de daños. Estas proteínas están ausentes en *Chlamydia trachomatis*, lo que sugiere mayor dependencia de enzimas detoxificantes y también es posible la existencia de una respuesta constitutiva como en *M. Tuberculosis*.

C. pneumoniae es capaz de sobrevivir y persistir en el interior de las células mononucleares de la sangre periférica, metabólicamente activa pero en un estado no cultivable. Boman y cols¹²⁵., en un estudio realizado en Suecia, comunicaron que el 46% de la población masculina de los donantes de sangre de edad media mostraban, mediante PCR, la presencia de DNA de *C. pneumoniae* en células mononucleares de sangre periférica así como en casi el 60% de los pacientes con patología coronaria. Sin embargo no sabemos si la presencia de DNA supone la existencia de bacterias viables e infecciosas.

3.5.2.2. Infección de las células endoteliales.

La activación de células endoteliales infectadas por *C. pneumoniae* puede medirse mediante los marcadores específicos, ELAM-1 e ICAM-1, que son moléculas de adhesión. Estas moléculas permiten la unión de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T citotóxicos dando lugar a una respuesta inmune que podría dañar el endotelio y producir vasculitis en cualquier vaso sanguíneo de cualquier tejido. La suelta de CEs al lumen del vaso puede originar la diseminación a más órganos a través de la sangre. Esto podría resultar en múltiples y cambiantes procesos habitualmente considerados enfermedades autoinmunes.

3.5.2.3. Infección de los tejidos inflamados.

El siguiente factor sería la habilidad teórica de producir inflamación persistente en cualquier tejido con inflamación previa. La inflamación implica un proceso de angiogénesis y reclutamiento de células sanguíneas con macrófagos, células del músculo liso y linfocitos T. Esto es lo que sucede en la arteriosclerosis en la cual se ha implicado a *C. pneumoniae* como factor etiopatogénico. Si la bacteria esta presente en la circulación como CE o en el interior de las células mononucleares, puede infectar secundariamente cualquier zona con inflamación previa, hacerse persistente y promover aun más el proceso inflamatorio actuando como un proceso autoinmune.

3.5.2.4. Persistencia de *C. pneumoniae*.

La persistencia natural de las infecciones por clamidiales es el principal factor inmunopatológico que debe ser considerado.

La infección persistente se define como la asociación a largo plazo entre un microorganismo y su célula huésped en la cual los microorganismos hospedados

permanecen en un estado viable pero no cultivable. Esto se ha podido comprobar para la infección clamidial mediante cultivos celulares^{123,126}. La capacidad innata de estos microorganismos para permanecer en la célula huésped, sin crecer ni replicarse, ha sido reconocida como uno de los principales factores en la patogénesis de la enfermedad en pájaros y animales¹²³ y puede que también sea así en humanos.

Las células infectadas por *C. pneumoniae* pueden no progresar hacia la lisis celular con la consiguiente suelta de CEs, sino que el microorganismo permanece metabólicamente inactivo en el interior de la célula y en un estado viable aunque el cultivo de estas formas es negativo. Este estado intracelular no cultivable se denomina **forma críptica** y su persistencia **infección críptica**¹²⁴. Las formas crípticas presentan alteraciones en la morfología y en la expresión antigénica así como menor infectividad. Esto hace que la demostración de la infección persistente en estas células sea difícil.

Las células huésped con infección críptica también pueden absorber nuevos CEs, heterólogos o de la misma especie, pero su diferenciación y replicación está detenida. En cualquier caso puede ocurrir la ocasional emergencia de nuevos ciclos infecciosos y producción de CEs.

Aunque no replicativas, las formas crípticas están implicadas en la producción activa de las *heat shock proteins* (HSPs) y por lo tanto un importante papel en la patogénesis de la enfermedad.

3.5.2.5. Persistencia de *C. pneumoniae* y producción de las *Heat Shock Proteins*.

Las HSPs son proteínas termosensibles, con diferentes pesos moleculares, sintetizadas por todas las células eucariotas y procariotas en pequeña cantidad. En situaciones de estrés, la respuesta celular aumenta considerablemente la producción de HSPs como sucede ante las infecciones virales, el déficit de glucosa, la anoxia, el aumento

de la temperatura, la exposición a peróxidos y otros. Las HSPs intervienen en la conformación espacial de complejos proteicos en el retículo endoplásmico rugoso y las mitocondrias. La estructura de estas proteínas está altamente conservada a lo largo de la evolución y es similar en bacterias, levaduras, plantas y animales, reflejando así su importancia¹²⁷.

Las HSPs inducidas por los microorganismos actúan como antígenos mayores, activando los linfocitos CD4 y CD8 que reconocen y lisan los macrófagos que hiperproducen HSPs en respuesta a la infección por patógenos intracelulares o a otros factores de estrés, como el calor o el INF- γ .

Por lo expuesto la producción de HSPs puede ser un factor principal en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Así en pacientes con artritis reumatoide, se ha visto la respuesta específica de linfocitos T contra HSPs y también se ha observado que las células beta del páncreas, que son la diana de los linfocitos T en la diabetes insulino-dependiente, expresan HSPs¹²⁴.

Las *Chlamydial Heat Shock Proteins* (CHSPs) se encuentran en la superficie de los CEs y CRs y están altamente conservadas entre especies, especialmente entre *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. En un trabajo de Gerard y cols¹²⁸, se sugiere la existencia de *C. trachomatis* capaz de expresar HSPs en el líquido sinovial de pacientes con artritis reactiva. La respuesta inmune retardada en humanos responde, entre otros antígenos, a las CHSP de 60 y 57 kDa (CHSP60 y CHSP57)¹²⁹. La CHSP60¹³⁰ es una proteína análoga a la proteína de *heat shock*, GroEL, de *Escherichia coli* y se la ha correlacionado con la inducción de la intensa inflamación y daño inmunopatológico en el tracoma, la infertilidad tubárica y la enfermedad inflamatoria pélvica. Otra proteína, la CHSP10, homóloga de GroES, también se la ha relacionado con la infertilidad tubárica. Existen evidencias de la presencia de CHSP60 en las placas de ateroma y de su papel en la activación de los

macrófagos. Esta proteína interviene en la oxidación de las proteínas de baja densidad LDL, la inducción de metaloproteinasas y elaboración de citocinas, favoreciendo así el desarrollo de la arterioesclerosis^{124,131}. Las CHSPs también han sido potencialmente implicadas en la inflamación bronquial del asma^{132,133}. *C. pneumoniae* y *C. trachomatis* comparten epítomos y quizás la CHSP60 también esté envuelta en la inmunopatogénesis del asma. Se está estudiando la asociación de CHSP60 con la producción de inmunoglobulina A (IgA) específica para *C. pneumoniae* en pacientes asmáticos³⁵. Las CHSPs pueden promover la enfermedad crónica por dos caminos: la estimulación antigénica directa y la actuación como transductores de señales que activan los macrófagos. Por otro lado las citocinas producidas en respuesta a las CHSPs sugieren un predominio de la respuesta Th1. La respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por Th1 se la considera un importante factor en el desarrollo de la salpingitis crónica, aborto precoz, infertilidad tubárica y tracoma.

3.5.2.6. Inducción de la persistencia de *C. pneumoniae*.

Los siguientes mecanismos puede inducir la infección críptica:

- a) *La reducción de la actividad metabólica y limitación de nutrientes* durante el desarrollo normal del ciclo de la bacteria que retrasa la diferenciación y detiene el crecimiento dando lugar a las formas crípticas atípicas.

- b) *La exposición a agentes antimicrobianos* como la penicilina y diferentes antibióticos que inhiben la producción de CEs pero puede originar formar aberrantes de CRs, formas grandes e hinchadas de las que brotan formas picnóticas a modo de hijas denominadas, “cuerpos reticulados en

miniatura^{123,134,135,136}. Estas formas también se han observado en células huésped tratadas con cicloheximida. Los efectos de los antibióticos parecen depender de la concentración y del estadio del ciclo de desarrollo clamidial y aunque sus dianas son diferentes para cada agente pueden generar persistencia intracelular del patógeno.

- c) *Mediadores inmunológicos como el propio INF- γ* . Se ha observado in vitro que altas concentraciones de INF- γ inhiben la producción de CEs, pero bajos niveles inducen el desarrollo de formas aberrantes de CR con diferente expresión antigénica¹²³. Tras retirar la influencia del INF- γ el ciclo celular se reanuda produciendo CEs.

3.5.2.7. Importancia clínica de la infección persistente.

Las infecciones clamidiales son una importante causa de infección latente en pájaros. En el humano, *C. pneumoniae* puede infectar el tracto respiratorio en su totalidad y replicarse en el interior de los macrófagos alveolares sin ser destruida por ellos, lo que puede ser origen de enfermedad crónica ocasional.

Se ha observado la persistencia de *C. pneumoniae* en el cultivo de nasofaringe de sujetos que han sufrido una infección respiratoria aguda incluso después de recibir tratamiento antibiótico¹³⁷. Los individuos con infección persistente pueden actuar como reservorio de la bacteria sin que conozcamos la relevancia clínica que esto. También se ha demostrado en modelos animales la capacidad de *C. pneumoniae* para diseminarse e infectar las células endoteliales y del músculo liso de los vasos sanguíneos¹²³. Por lo tanto existe la posibilidad de que *C. pneumoniae* se pueda diseminar ampliamente por el

organismo y causar numerosas infecciones crónicas ocultas como el desarrollo de la arteriosclerosis.

3.5.2.8. Terapia antimicrobiana e infección persistente.

El tratamiento antibiótico durante varias semanas parece curar clínicamente la infección genital por *C. trachomatis*. Es posible que la descamación y renovación continua de las células epiteliales limite la persistencia de la bacteria. Pero existe la posibilidad de persistencia en los tejidos profundos, como se ha observado en estudios animales con *C. psittacci*^{123,138}. Las infecciones repetidas del tracto genital en animales, bien por reinfección, persistencia o recaída, son más graves debido a la respuesta inmune del huésped.

La persistencia de cultivos positivos en pacientes con síntomas de infección aguda que han recibido tratamiento indica la dificultad para erradicar el microorganismo a pesar de la respuesta clínica en la enfermedad aguda¹³⁷. La terapia corta con los agentes comunmente empleados puede hacernos creer que hemos erradicado la infección, pero en realidad producirse formas crípticas que pueden potenciar las secuelas a largo plazo, como la arterioesclerosis, en lugar de prevenirlas.

3.5.2.9. Inmunidad celular y *C. pneumoniae*.

La inmunidad celular es fundamental en la defensa contra organismos intracelulares como la familia *Chlamydiaceae*. Esta respuesta puede ser también responsable de la inmunopatología de la infección¹²⁴.

Los linfocitos CD4 son activados por antígenos clamidiales que se unen a las moléculas HLA de clase II y son expuestos en la superficie del macrófago, dendritas,

células endoteliales y demás células huésped. El reconocimiento del antígeno da lugar a la secreción de citocinas que atraerán más macrófagos y estimularán la producción de anticuerpos en los linfocitos B.

Los linfocitos CD8 requieren INF- γ para ser activados. Estas células reconocen antígenos peptídicos unidos a las moléculas HLA de clase I, que son expresadas por todas las células nucleadas. Las células CD8 activadas responden de diferentes maneras, produciendo más INF- γ , estimulando o suprimiendo la citolisis.

La evolución de la respuesta inmune a la infección clamidial puede ser curativa o inmunopatológica y parece determinada antigénicamente. Así la respuesta a MOMP parece proporcionar protección mientras que las CHSP estimularían una respuesta patológica que dañaría los tejidos.

Los principales reguladores y en parte determinantes de la evolución de la respuesta inmune son las citocinas producidas por los subtipos celulares Th1 o Th2 (ver apartados 2.5.1.2 y 2.5.8). En el caso de la respuesta Th1 y producción de INF- γ , parecen jugar un papel fundamental en la inmunidad frente a la infección clamidial de tal forma que el predominio de una respuesta Th2, con baja producción de INF- γ , inductor de formas aberrantes, conduce al desarrollo de una infección persistente con organismos viables. Otro marcador de la activación de Th2 es el aumento de inmunoglobulina A (IgA) mediado por IL-10 que es secretada por células Th2.

3.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR C. PNEUMONIAE.

C. pneumoniae parece tener un especial tropismo por las células del epitelio respiratorio y está relacionada con la producción de cuadros clínicos a lo largo de toda la vía respiratoria que incluyen la neumonía, bronquitis, sinusitis, faringitis y otitis media¹³⁹.

La neumonía y la bronquitis¹⁴⁰ son las enfermedades que se asocian con más frecuencia con la infección por *C. pneumoniae*, aunque la infección subclínica o asintomática es la manifestación más habitual. Puede ser responsable del 5-10% de los casos de neumonías admitidos en un hospital y hasta del 45% del total de las neumonías y bronquitis adquiridas en la comunidad así como del 1-9% de las infecciones de vías respiratorias altas^{141,142}. También existen casos de neumonía nosocomial por *C. pneumoniae*¹²¹ y se considera que es causante del 5-9% de los casos de agudizaciones de enfermedades crónicas respiratorias¹⁴³.

Todas las especies de *Chlamydia* y *Chlamyphilas* tienen tendencia a producir infecciones crónicas de tal forma que el espectro de enfermedades relacionadas con *C. pneumoniae* ha ido aumentando en los últimos años, y actualmente se plantea su asociación con enfermedades crónicas respiratorias como la sarcoidosis, la bronquitis crónica obstructiva (BNCO), el asma y también la arteriosclerosis, la enfermedad coronaria y la esclerosis múltiple^{144,145}.

3.6.1. Infecciones de las vías respiratorias.

En los adolescentes y adultos jóvenes la infección primaria puede presentarse en forma de neumonía leve o bronquitis prolongada, pero generalmente es subclínica o asintomática. En adultos lo habitual es la reinfección, que con frecuencia coexiste con la infección por otros patógenos.

El cuadro clínico de la neumonía se asemeja a la neumonía atípica primaria por *Mycoplasma pneumoniae*, sin existir síntomas específicos aunque algunas características clínicas pueden ayudar a su distinción^{67,80,86,144}. Aunque la frecuencia de la faringitis no está clara, con cifras que van del 8–20%¹⁴⁶, el dolor de garganta es el síntoma más común entre los pacientes que posteriormente desarrollan una infección del tracto respiratorio

inferior. El curso clínico puede ser bifásico, con la resolución de la faringitis y posterior desarrollo de la bronquitis típica o neumonía. La tos es muy frecuente y prolongada y pueden aparecer mialgias torácicas. La presencia a su vez de sinusitis o bronquitis, especialmente de ronquera, apuntan a favor de la infección por *C. pneumoniae*. Por el contrario la diarrea y la otitis son mucho más frecuentes en la neumonía por *M. pneumoniae* y responde mejor a la eritromicina.

La neumonía habitualmente es benigna, pero en personas mayores y en algunas ocasiones puede ser grave. La fiebre suele estar ausente, y el periodo de tiempo que tarda el paciente en acudir al médico es más largo que para otras infecciones respiratorias¹⁴⁷. Radiológicamente se puede observar en los casos más leves o que no requieren hospitalización, un infiltrado intersticial y/o condensación pequeña subsegmentaria que desaparece rápidamente incluso sin tratamiento. En pacientes graves puede existir derrame pleural¹⁴⁸. La auscultación no es llamativa y el recuento leucocitario suele ser normal pero la velocidad de sedimentación está elevada. Tampoco hay elevación del título de crioaglutininas. El estudio citológico del lavado broncoalveolar se caracteriza por una alveolitis linfocítica con predominio de linfocitos CD8 que pudiera reflejar una respuesta inmune celular¹⁴⁹.

Se puede decir que ante un cuadro de neumonía atípica, antecedentes de ronquera, tos persistente, afebril y que ha tardado en consultar al médico debemos pensar en la presencia de *C. pneumoniae*⁶⁷. La recuperación es lenta incluso en los casos más leves y a pesar del tratamiento antibiótico adecuado, persistiendo la tos y el malestar varias semanas. En los adultos mayores el curso clínico puede ser más grave, así como en los pacientes con enfermedades subyacentes, en los que se dan la mayor parte de los casos de muerte y/o complicaciones con bacteriemia neumocócica^{110,122}. Sin embargo no está bien definido su papel como agente oportunista, ya que se han comunicado casos de neumonía grave con

fallo respiratorio y presencia de derrame pleural junto a hepatoesplenomegalia en adolescentes y niños mayores¹⁵⁰. En un caso se consiguió incluso aislar el microorganismo en el líquido pleural¹⁴⁸. La neumonía por *C. pneumoniae* puede asemejarse a la infección por *Pneumocystis carinii* y presentar infiltrados bilaterales¹⁵¹. No obstante, se ha aislado la bacteria en el pulmón de pacientes con infección por VIH y detectado por PCR en el lavado broncoalveolar de estos pacientes, generalmente junto a otros patógenos como *P. carinii* y *M. tuberculosis*, así como en otras inmunodeficiencias^{152,153}. Por otra parte se han encontrado prevalencias más altas de infección entre pacientes con infección HIV¹⁵⁴. También se ha asociado con neumonía en pacientes con anemia por células falciformes¹⁵⁵. De todos modos, aún no está determinado si los pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades de base tienen o no más riesgo de sufrir infección por *C. pneumoniae* o padecer una enfermedad más grave.

La existencia de reinfecciones indica que los anticuerpos no deben ser protectores, pero en general el curso de las infecciones secundarias es más leve.

Otras infecciones de vías respiratorias asociadas con *C. pneumoniae*, con frecuencia acompañando a los cuadros de neumonías, son la sinusitis purulenta, la otitis media, la laringitis y amigdalitis^{156, 157}.

3.6.2. Enfermedades crónicas pulmonares.

Existen evidencias que sugieren una fuerte asociación entre la infección por *C. pneumoniae* y el aumento de la reactividad bronquial y el broncoespasmo así como con el desarrollo de una bronquitis asmática tras una infección aguda respiratoria¹⁵⁸.

También se ha observado que la infección es más común entre personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (BNCO), dada la alta prevalencia de anticuerpos

a *C. pneumoniae* en estos pacientes. Para algunos autores sería responsable de un 4-5% de las exacerbaciones de las bronquitis crónicas, y la infección crónica frecuente^{159,160}

Otras enfermedades crónicas pulmonares en las que se ha relacionado la presencia de infección aguda por *C. pneumoniae* y exacerbación de su estado basal son la fibrosis quística, y la panbronquiolitis difusa^{161,162}.

3.6.3. Sarcoidosis.

Existen evidencias indirectas que apoyan la relación entre la infección clamidial y la patogenia de la sarcoidosis¹⁶³. Se han observado anticuerpos específicos frente a *C. pneumoniae* elevados de forma persistente en enfermos de sarcoidosis. También se ha visto una correlación positiva respecto a las concentraciones de ECA (enzima convertidora de angioténsina) y de lisozima, así como un aumento del número de linfocitos T recuperados en el lavado broncoalveolar y de la captación del galio en los tejidos junto con formas granulomatosas en el hígado^{67,164}. También se han comunicado casos de pacientes que presentaban un cuadro clínico compatible con sarcoidosis y en los que luego se demostró infección por *C. psittaci*^{165,166}. La bacteria puede actuar como un antígeno desencadenante de la enfermedad, de forma similar a como lo haría el berilio, agente inductor de la beriliosis humana, enfermedad similar a la sarcoidosis⁶⁷.

3.6.4. Manifestaciones extrapulmonares.

La neumonía puede complicarse con manifestaciones extrapulmonares como tiroiditis, eritema nodoso, encefalitis, meningorradiculitis, síndrome de Guillain-Barré^{167,168,169} y síndrome de Reiter¹⁷⁰. También se ha comunicado un caso complicado con meningitis, iritis, hepatitis y eritema nodoso atípico¹⁷¹.

3.6.5. *C. pneumoniae*, arteriosclerosis y enfermedad coronaria.

En los años 40 se observó que *C.trachomatis*, podía provocar oclusión no sólo de los vasos linfáticos en el linfogranuloma venereo sino también de los vasos sanguíneos, aunque este hallazgo paso inadvertido¹⁷². En los últimos años varios estudios han demostrado una asociación entre la presencia de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* y la cardiopatía isquémica. En el *Helsinki Heart Study*¹⁷³, llevado a cabo con 4000 sueros de varones hipercolesterolémicos se estableció que la presencia de complejos inmunes en relación con *C. pneumoniae*, suponían un factor de riesgo independiente para tener infarto de miocardio, aunque con efectos aditivos como la edad y el tabaquismo Los finlandeses Saikku y cols¹⁷⁴. en 1988 pusieron de manifiesto la posible asociación entre la existencia de anticuerpos a *C. pneumoniae* y la enfermedad coronaria. En este estudio la probabilidad de presentar serología compatible con infección por *C. pneumoniae* era significativamente superior en los pacientes con cardiopatía isquémica, y los pacientes que sufrían un infarto de miocardio experimentaban seroconversión frente a *C. pneumoniae*. Posteriormente estos autores demostraron prospectivamente que pacientes con presencia de IgA específica de *C. pneumoniae* tenían un riesgo doble de sufrir un evento cardiaco en los 6 meses siguientes¹⁷⁵.

Existen estudios más recientes como el de Blasi y cols¹⁷⁶. que estudiaron la asociación entre *C. pneumoniae* e infarto agudo de miocardio (IAM) en 61 pacientes menores de 65 años. Para ello determinaron las seroprevalencias y títulos séricos de IgG, IgA e IgM y establecieron criterios de infección aguda, crónica y reinfección. Los autores encontraron diferencias significativas respecto a la seroprevalencia de infección crónica en los pacientes con IAM. Estos autores también sugieren que la reinfección podría actuar como desencadenante de un episodio de IAM. Thom y cols¹⁷⁷ encontraron mayor riesgo de

padecer enfermedad coronaria grave en pacientes con títulos de IgG $\geq 1:64$ que en aquellos con IgG $\leq 1:8$.

En el suero de pacientes con arteriosclerosis se han detectado anticuerpos dirigidos contra las HSPs de 42, 52 y 65 kDa, consideradas marcadores de infección crónica. Estas proteínas también han sido encontradas en altas concentraciones en lesiones ateroscleróticas⁶⁷.

Los efectos directos de los agentes infecciosos sobre la pared arterial incluyen la disfunción endotelial, la proliferación de células musculares lisas y la inflamación local pero parece más probable que sea a través de los mediadores de la inflamación crónica (proteína C reactiva, citoquinas y leucocitos) y los anticuerpos como se produzcan cambios en factores de riesgo como los lípidos, la homocisteína, el fibrinógeno y la inducción de un estado de hipercoagulabilidad¹⁷⁸. En un estudio en pacientes con angina inestable, los pacientes con títulos de IgA $\geq 1:64$, tuvieron niveles más altos de fibrinógeno que el resto¹⁷⁹. El mecanismo de acción del microorganismo puede ser agudo, precipitando la rotura de la placa de ateroma existente o favoreciendo su crecimiento y pudiendo dañar directamente el endotelio y el músculo arterial, o mediante un proceso inflamatorio crónico que de lugar a un daño secundario sobre las arterias o sobre los mecanismos patológicos de la lesión arterial¹⁸⁰.

Se ha postulado que los lipopolisacáridos de *C. pneumoniae* se unirían a las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) para hacerlas inmunógenas y capaces de unirse a los anticuerpos, dando lugar de esta forma al aumento de la producción de radicales libres que oxidan las LDLs. Los anticuerpos unidos a la LDL-oxidada provocan la acumulación de colesterol en los macrófagos dando lugar a la formación de células espumosas in vitro, proceso característico de la arteriosclerosis. A su vez el microorganismo y sus lipopolisacáridos inducen la producción del factor de necrosis tumoral que inhibe la

lipoprotein lipasa, alterando el metabolismo de los lípidos y favoreciendo el aumento de los triglicéridos en sangre¹⁷⁵

Se ha detectado *C. pneumoniae* en placas de ateroma de arterias coronarias, en el interior de los macrófagos y células musculares lisas de las placas y en muestras de endarterectomía mediante técnicas de inmunocitoquímica, PCR, microscopía electrónica y aislamiento en cultivo^{181,182,183 184,185}.

In vitro, *C. pneumoniae* es capaz de reproducirse no sólo en macrófagos, sino también en células musculares lisas y endoteliales. Existen modelos animales que muestran la relación entre la inoculación de *C. pneumoniae* y lesión arterial^{186,187}

Sin embargo la mayoría de los estudios que relacionan la infección persistente por *C.pneumoniae* y la enfermedad coronaria son pequeños y retrospectivos. Los estudios más amplios y prospectivos no encuentran asociaciones significativas entre la infección por *C. pneumoniae* y el riesgo de enfermedad coronaria. El más amplio es el estudio de Wald y cols¹⁸⁸. Los participantes eran 21520 hombres entre 35-64 años de edad, que acudieron a consultas de revisión en Londres entre 1975 y 1982. Se les sometió a un cuestionario para medir la presencia de factores de riesgo para enfermedad isquémica y se les extrajo muestras de suero para otros estudios que fueron congeladas. En 1994 se analizaron las muestras de suero congeladas de 647 pacientes que habían muerto por enfermedad isquémica y de 1294 controles sin enfermedad. Las concentraciones de IgG e IgA fueron similares en ambas poblaciones y no se encontró riesgo asociado con la infección por *C. pneumoniae*. En un meta-análisis realizado por Danesh y cols¹⁸⁹, que incluía 14 estudios prospectivos y 3169 casos con una edad media de 52 años, la “odds ratio” combinada de todos los trabajos entre los títulos de IgG y la incidencia de enfermedad coronaria no fue significativa tras su ajuste por edad, sexo, ciudad, hábito de fumador y estado socioeconómico tanto en la vida adulta como en la infancia. No hubo diferencias en la

heterogeneidad de las poblaciones de cada estudio por separado. Los autores rechazan la existencia de una fuerte asociación entre la infección por *C. pneumoniae* y la enfermedad cardíaca, pero indican que también son necesarios otros estudios para confirmar o rechazar ligeras asociaciones que pudieran existir especialmente en poblaciones más jóvenes.

Por lo tanto, el tamaño y el diseño prospectivo de los estudios son importantes para minimizar errores sistemáticos, aunque el trabajo de Danesh ha sido criticado por el exceso de ajuste al incluir la situación socioeconómica en la vida adulta y en la infancia, pues no está demostrado que esta sea una medida de exposición a la infección¹⁹⁰.

No conocemos cómo penetra *C. pneumoniae* en las placas de ateroma y si su presencia es necesaria o influye en el desarrollo de la placa, pero los estudios que muestran asociación cuestionan la hipótesis del espectador inocente, pero aún no podemos establecer la relación entre infección, inflamación, la formación de la placa ateromatosa y la arteriosclerosis.

3.6.6. Otros cuadros clínicos.

También se ha implicado a *C. pneumoniae* como agente causal de endocarditis con hemocultivos negativos¹⁹¹ y en algún caso de miocarditis¹⁹². En cambio, hasta la fecha no se ha asociado con casos de pericarditis¹⁹³.

También se ha enunciado su posible implicación en la patogenia de la esclerosis múltiple, ya que se ha aislado el microorganismo en cultivo de líquido cefalorraquídeo de estos pacientes y se ha detectado el gen del complejo mayor de la proteína de membrana externa de *Chlamydia pneumoniae*¹⁴⁵.

Se han detectado por técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de lipopolisacáridos clamidiales en aneurismas aórticos abdominales de pacientes operados, especialmente en el caso de hombres ancianos con bronquitis crónica e historia de tabaquismo¹⁹⁴.

No parece existir relación entre el síndrome de fatiga crónica y la infección aguda por *C. pneumoniae*¹⁹⁵.

3.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

3.7.1. Métodos Directos.

3.7.1.1. Aislamiento en cultivo.

C pneumoniae es una bacteria difícil de recuperar en cultivo y sus inclusiones son más pequeñas que las formadas por otras especies como *C. trachomatis*, cuya aislamiento en cultivo es más fácil. Tanto *C. trachomatis* como *C. pneumoniae* pueden ser cultivadas en células de saco vitelino de embrión de pollo⁷⁸, pero el medio de cultivo más sensible y de mayor facilidad de aplicación son las líneas celulares HL¹⁹⁶ y Hep-2¹⁹⁷. Líneas celulares usadas habitualmente para el aislamiento de *C. trachomatis* como Hela 229 y McCoy son poco sensibles para el aislamiento de *C. pneumoniae*⁸⁶. Al igual que con *C. trachomatis* la centrifugación del inóculo (1700g) y la adición de cicloheximida al medio de cultivo para inhibir el metabolismo de la célula huésped, aumentan la recuperación de microorganismos viables⁸⁶. Para la detección de las inclusiones en los cultivos inoculados se utilizan anticuerpos monoclonales específicos de especie Mab-TWAR conjugados con fluoresceína. Podemos emplear tinciones con Giemsa y ver las inclusiones en un microscopio de campo oscuro. Es sencillo y barato pero podemos confundirnos con los artefactos del cultivo.

3.7.1.1.1. Obtención y transporte de las muestras para cultivo.

La muestra que habitualmente se recoge para el aislamiento en cultivo de *C. pneumoniae* es la torunda orofaríngea, aunque obtenemos mejores resultados si la toma es

de nasofaringe o con lavados orofaríngeos. La muestra de esputo es menos satisfactoria para el aislamiento de la bacteria ya que puede contener sustancias citotóxicas para el cultivo. También pueden utilizarse el lavado broncoalveolar y el líquido pleural¹⁹⁸. El principal problema para su aislamiento es la rápida pérdida de microorganismos viables a temperatura ambiente. La torunda nasofaríngea debe introducirse en un medio de transporte que es un tampón fosfato con sucrosa y ácido glutámico (SPG), o bien en medio de Eagle con un 10% de suero fetal bovino, o medio VTM para el transporte de virus, y refrigerada a 4°C para evitar su inactivación. Los microorganismos son también susceptibles a la congelación y descongelación rápida. Si su procesamiento no va a ser inmediato debe guardarse la muestra a 4° de 1-4 h y posteriormente congelar a -70°. El medio de cultivo debe mantener unas concentraciones de NaCl superiores 80mM y un PH entre 5-8 para obtener un buen rendimiento. El crecimiento es lento 3-7 días incubándose a 35°C y se necesitan varios subcultivos para aumentar el número de cuerpos elementales.

Para aumentar la sensibilidad del cultivo, actualmente se emplea la técnica del *shell vial*¹⁹⁹. Se utilizan monocapas celulares depositadas sobre cubreobjetos redondos que se introducen en tubos con fondo plano. Se realiza la inoculación por duplicado, tras concentrar la muestra en el medio de transporte a 10.000 g durante 45 minutos y a 4°C. Las células adsorben los cuerpos elementales de la muestra y una vez inoculados los tubos estos se vuelven a centrifugar, esta vez con el inóculo en la monocapa, a 2000 g durante 45 minutos. El medio celular debe contener cicloheximida (1µg/ml). Tras incubar los viales durante 48 horas se extrae el cubreobjetos de una de las monocapas celulares incubadas y se realiza una tinción inmunofluorescente. El otro vial se utiliza para subcultivo o pase ciego recomendándose al menos dos subcultivos. Tras detectar los CEs con anticuerpos monoclonales específicos de género, se procede a tipificar el aislamiento mediante

inmunotipificación, microscopía electrónica o secuenciación del dominio VS-IV del gen *omp-I* del complejo MOMP.

Aunque el aislamiento en muestras clínicas de tracto respiratorio inferior y tejido pulmonar en presencia de clínica compatible nos indica infección invasiva, el aislamiento en muestras respiratorias de vías altas como la nasofaríngea pueden tan sólo reflejar colonización.

3.7.1.2. Detección directa de antígeno.

A pesar de su utilidad en el cultivo, la inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales específicos teñidos con fluoresceína o peroxidasa ha mostrado poca sensibilidad en la demostración directa del organismo o de los cuerpos de inclusión sobre la muestra clínica, y poca especificidad por la presencia de artefactos (moco y secreciones). La sensibilidad de la detección de antígeno con Mabs en frotis faríngeos fue sólo del 50%⁸⁰. Por otro lado hay autores que le dan una sensibilidad del 80% y una especificidad del 98% si se realiza la IFD inmediatamente tras la recogida de la muestra y ante la presencia de síntomas clínicos, y consideran un resultado negativo la presencia de células libres de la bacteria²⁰⁰. Aunque es una técnica rápida y puede ser útil, sigue siendo muy subjetiva de interpretar y poco práctica de aplicar cuando se procesan un gran número de muestras.

Los métodos inmunoenzimáticos o ELISA, que emplean anticuerpos mono o policlonales frente a lipopolisacáridos son rápidos, automatizados, permiten procesar un número grande de muestras y eliminan la subjetividad del observador. Sin embargo la detección de antígeno de *C. trachomatis* mediante ELISA con anticuerpos genero-específicos también ha mostrado una pobre sensibilidad⁸⁶.

3.7.1.3. Detección directa con técnicas moleculares.

Las técnicas de biología molecular son empleadas en la detección directa en el tejido de microorganismos difíciles de cultivar o detectar como la *C. pneumoniae*. Se ha empleado la hibridación directa en el tejido con sondas marcadas, como es el caso de las placas de aterosclerosis, pero la sensibilidad es baja y la técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

3.7.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

La PCR detecta microorganismos que han dejado de ser viables durante el transporte, y permite además detectar microorganismos no cultivables durante una infección persistente^{96, 201}.

Se han utilizado varios primers específicos de la secuencia genómica de *C. pneumoniae* tanto en la amplificación simple como en la reamplificación^{202,203}. Las dianas genómicas empleadas incluyen secuencias del RNA ribosómico 16S, el gen *omp-1* del complejo MOMP, el gen de la MOMP de 60 kDa, rica en cisteína y secuencias codificadas de función desconocidas. La técnica sigue los procedimientos habituales de la PCR con distintas modificaciones^{204,205}.

La PCR tiene una alta especificidad respecto al cultivo y una sensibilidad que oscila en torno al 75%²⁰³. Se ha detectado el microorganismo en muestras de torundas faríngeas^{202,140} y nasofaríngeas²⁰³, gargarismos faríngeos²⁰⁶, lavado broncoalveolar²⁰⁷, esputo²⁰⁸ y en tejidos frescos. Al igual que en el cultivo la mayor sensibilidad se obtiene con muestras de nasofaríngea siendo bajo el rendimiento de las muestras de esputo. La sensibilidad de la técnica al parecer disminuye en tejidos fijados en formalina o montados

en bloque. Grayston y cols^{183,184}. obtuvieron mayor sensibilidad con las técnicas inmunocitoquímicas.

La detección positiva sin que exista infección activa^{203,274} es uno de los inconvenientes de la técnica. Esto puede afectar a la especificidad diagnóstica de la técnica al dar valor diagnóstico a un hallazgo que no lo tiene. De nuevo la detección positiva en muestras de tejido respiratorio superior, sin respuesta serológica acompañante, puede indicar sólo colonización, o bien daño persistente, en lugar de ser la causa de la neumonía^{58,209}. Recordemos que *C. pneumoniae* es capaz de producir infecciones persistentes sin clínica aparente. En el caso de *C. trachomatis* en las infecciones más superficiales (uretritis, proctitis), puede faltar la detección de anticuerpos y ser positivo el aislamiento de la bacteria⁹⁰.

La técnica DNA PCR tampoco puede distinguir organismos muertos de organismos vivos después de un tratamiento antibiótico, pero la detección de RNA mensajero, mediante la técnica de la transcriptasa inversa-PCR indicaría actividad metabólica²¹⁰.

Otra desventaja de la PCR, es que se dan falsos negativos por la presencia de inhibidores de la amplificación como moco y sangre y de ADNasas en la muestra.

Por otra parte es una técnica compleja de realizar, costosa, y no estandarizada entre laboratorios lo que dificulta su empleo para el diagnóstico a gran escala. Sin embargo, su empleo puede proporcionar un diagnóstico precoz de la neumonía comunitaria, bronquitis y neumonía en pacientes inmunocomprometidos, especialmente cuando disponemos de un sólo suero. Sólo un 23% de los pacientes con detección positiva por PCR y/o cultivo positivo cumplen los criterios serológicos de infección aguda en el primer suero²⁰³, por lo tanto cuando la PCR es negativa es necesaria la obtención de un segundo suero a las 3 semanas. Con la PCR podemos también detectar la presencia de otros patógenos

implicados en los casos de coinfección. También con la PCR se ha conseguido detectar el microorganismo en placas de ateromas coronarios¹⁸⁴ y muestras de aterectomía^{211,212}.

3.7.2. Métodos Indirectos.

3.7.2.1. Serología.

3.7.2.1.1. Test de Microinmunofluorescencia (MIF).

El único método de referencia aceptado por su sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos clamidiales específicos de especie es la microinmunofluorescencia indirecta, MIF²¹³, desarrollada originalmente por Grayston y Wang en 1970²¹⁴. Es también el más utilizado en la rutina diagnóstica. Esta técnica es un inmunoensayo indirecto basado en el principio “sandwich”, por el cual se detecta la presencia en el suero de anticuerpos específicos dirigidos contra un antígeno que está fijado en una fase sólida, que suele ser un portaobjetos de vidrio, plástico o una membrana de celulosa y al que se unen tras un periodo de incubación formando complejos antígeno-anticuerpo. Posteriormente, tras un lavado para retirar los anticuerpos que no se hayan unido, se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina humana marcados con un fluorocromo que nos permitan detectar por microscopía los complejos que se hayan formado en la primera fase. En la MIF de *Chlamydia* spp y *Chlamydophila* spp se utilizan CEs purificados como sustrato para la detección de anticuerpos IgG, IgA e IgM específicos. Un resultado positivo está basado en la reacción con el MOMP del CE, que contiene los antígenos específicos de especie. Para evitar reacciones cruzadas es necesario retirar del CE el antígeno LPS que es específico de género. La preparación del antígeno clamidial para la MIF ha de hacerse en membranas vitelinas de huevo embrionado y es un procedimiento estandarizado, existiendo kits comerciales con los portaobjetos preparados con el sustrato. El inconveniente de la MIF es su dificultad de interpretación ya que está

sujeta a la subjetividad y experiencia del observador. La MIF también ha sido criticada por no ser absolutamente específica para la detección de anticuerpos en personas con cultivo positivo pero puede deberse a la lenta aparición de la respuesta de anticuerpos a MOMP.

3.7.2.1.2. Fijación del Complemento (FC).

La FC sólo detecta anticuerpos específicos de género, dirigidos contra el LPS. El LPS es el responsable de la reacción específica de género y por lo tanto puede dar lugar a reacciones cruzadas entre especies de *Chlamydia* o *Chlamydophilas*. Tampoco podemos distinguir entre las tres fracciones de inmunoglobulinas, IgA, IgM e IgG, no siendo por lo tanto útil para el diagnóstico de reinfecciones al no distinguir entre infección aguda e infección persistente²¹⁵. Estudios comparativos dan una sensibilidad del 10,3% para la FC, del 72,4% para el EIA y del 80% para la MIF²¹⁶.

3.7.2.1.3. Métodos inmunoenzimáticos. Ensayo inmunoabsorbente LPS recombinante (rDNA LPS ELISA).

El rDNA LPS ELISA utiliza un antígeno LPS recombinante que contiene epítomos específicos de género con el que es posible detectar anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM. Como desventaja presenta la existencia de reacciones cruzadas entre especies, pero por otro lado una ventaja de los anticuerpos anti-LPS es su rápido desarrollo. Además esta técnica es fácil de estandarizar para su uso en la rutina del laboratorio. Pero aún se conoce poco de su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, así como de su utilidad en estudios de seroprevalencia. Los anti-LPS son precoces pero su vida media es mucho menor que las de los anti-MOMPS. Así mismo existe un aumento de la seroprevalencia de anticuerpos clamidiales detectados por rDNA LPS ELISA y FC en pacientes con

infección reciente por *Mycoplasma pneumoniae*. Se piensa que se debe a una activación policlonal de las células B en la infección por *M. pneumoniae*. En los pacientes en los que se ha observado esta posible correlación no se observaron cambios en los títulos de IgM anti-LPS. El uso de muestras de suero pareadas con un intervalo de 10 días puede solucionar el problema de interpretación. El rDNA LPS ELISA puede ser útil en el diagnóstico de rutina de la infección aguda por *C. pneumoniae*, pero es necesario que esta técnica sea más evaluada²¹⁵.

3.7.2.1.4. Inmunocomplejos circulantes.

Podemos detectar la presencia de inmunocomplejos circulantes formados por anticuerpos unidos al antígeno de *C. pneumoniae* y establecer el “índice de anticuerpos” o proporción entre los anticuerpos libres y anticuerpos disociados o unidos al antígeno. Los anticuerpos libres son determinados por MIF y los anticuerpos disociados se separan por precipitación del suero con polietilenglicol (7%) y borato sódico (ph4). El sedimento es lavado con polietilenglicol (3%) y borato sódico (ph 7,4) y solubilizado en un volumen de borato sódico (ph 12) igual al del suero original, para finalmente realizar la MIF²¹⁷.

3.7.3. Diagnóstico serológico: respuesta de anticuerpos y criterios diagnósticos.

Es necesario la presencia de un nivel mínimo de anticuerpos o una seroconversión para establecer un diagnóstico serológico de infección, así como la detección de las tres clases de anticuerpos IgG, IgM e IgA si queremos distinguir entre los distintos modelos de infección; aguda, reinfección o reactivación, infección crónica o persistente e infección antigua^{100,120,218}.

3.7.3.1. Infección aguda.

Con FC se considera la presencia de infección aguda por alguna especie de *Chlamydia* si se alcanza una concentración de anticuerpos polivalentes $\geq 1:64$, o se produce la elevación al cuádruplo de los títulos de anticuerpos polivalentes o seroconversión en dos muestras de suero pareadas, obtenidas al menos con un intervalo de 4 semanas.

Con MIF la seroconversión o elevación al cuádruplo de los títulos de IgG o IgA y/o la presencia de IgM a títulos $\geq 1:16$, se consideran de forma unánime evidencia de la presencia de infección aguda por *Chlamydia pneumoniae* y como posible infección aguda o activa la presencia en un sólo suero de un título de IgG $\geq 1:512$, o de IgA $\geq 1:256$ ^{120,218}. La ausencia de IgM ante títulos elevados de IgG y/o IgA se considera reinfección. Títulos de IgG $\geq 1:16 < 1:512$ en ausencia de IgM y títulos de IgA $\geq 1:16 < 1:256$ se consideran infección pasada o antigua¹²⁰. Podemos tener falsas IgM positivas en pacientes con factor reumatoide circulante, factor cuya prevalencia aumenta con la edad y hace necesario la extracción previa del factor reumatoide IgG del suero del pacientes con antisueros específicos²¹⁹.

El seguimiento serológico nos permite observar que la IgM suele empezar a disminuir a los dos meses desapareciendo a los 4-6 meses tras la infección aguda mientras que la IgG puede persistir alta incluso durante varios años^{86,90,220}. Si no hay reinfecciones el declinar de los títulos de IgG puede llegar a valores inferiores a 1:8 en 16 meses⁹⁰. El tiempo de persistencia es mayor y el declinar de los títulos es más lento tras una reinfección que tras una primoinfección y tanto en adultos como en niños. También se han detectado IgM persistentes durante un año²²¹.

Aunque en la MIF se emplean antígenos MOMP, específicos de especie, es aconsejable realizar a la vez la detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* y *C. psittaci* para detectar posible reacción cruzada. Ante la sospecha de infección aguda por *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, la detección de IgM específica es altamente diagnóstica de infección aguda pero en el caso de *C. trachomatis* es menos predictiva, pues sólo del 23 al 33% de los pacientes con detección positiva se acompañan de infección activa²²². Los puntos de corte en MIF para considerar la presunta infección activa por *C. trachomatis* y *C. psittaci* son IgG \geq 1:64. Títulos inferiores de IgG sugieren infección antigua²²³. La presencia de IgA de nuevo puede indicar persistencia.

3.7.3.2. Infección crónica.

La detección persistente de IgA específica en el suero por MIF o en secreciones respiratorias sugiere la persistencia de la infección^{175,218}, estado de portador activo y/o reinfección puesto que los anticuerpos IgA, que son de vida media corta²²⁴, no duran más de una semana, mientras que la presencia persistente de anticuerpos elevados IgG, de vida media larga, podría ser indicativo de infecciones previas recurrentes²²⁵.

Sin embargo los criterios serológicos para establecer el punto de corte que defina la cronicidad no están establecidos puesto que no se ha observado la correlación entre los títulos de anticuerpos y la detección del organismo en los tejidos²²⁶.

3.8. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR C. PNEUMONIAE.

3.8.1. Antimicrobianos y eficacia clínica.

El estudio de la sensibilidad se realiza mediante la adición de los antimicrobianos al cultivo celular. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir la formación de cuerpos de inclusión tras 48-72 horas de incubación. La concentración mínima bactericida (CMB) calcula la capacidad de supervivencia y se considera la menor concentración de antibiótico con la que no aparecen cuerpos de inclusión tras la resiembra en cultivos celulares libres de antibióticos²²⁷.

Los antimicrobianos que alcanzan altas concentraciones intracelulares son los que mejor actividad presentan frente a los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*. Por lo tanto los macrólidos, tetraciclinas y últimamente algunas quinolonas parecen los más eficaces. *C. pneumoniae* y *C. psittaci* son resistentes a las sulfamidas. Los betalactámicos consiguen alterar el crecimiento y la división celular dando lugar a forma aberrantes, por lo que es posible que la bacteria posea estructuras similares al peptidoglicano en su pared celular.

Las CMI más bajas in vitro se consiguen con las tetraciclinas y los macrólidos, en el ámbito de 0,004 a 0,5 mg/l, los cuáles han sido considerados clásicamente tratamiento de primera línea (tabla 4). Las quinolonas también presentan buena actividad (de 0,01 a 4 mg/l) pero son más inespecíficos, mientras que la ampicilina, cloranfenicol y clindamicina tienen una actividad media (CMI 0,2-4 mg/l). La vancomicina y los aminoglucósidos no muestran actividad (CMI >256 mg/l).

Tabla 4. Antibióticos con actividad in vitro frente a *C. pneumoniae* y con utilidad clínica.

ANTIBIÓTICOS	CMI (mg/l)
Tetraciclinas ^{228,229}	
Doxiciclina	0,02-0,25
Tetraciclina	0,06-1
Macrólidos ^{228,229,230}	
Eritromicina	0,01-0,25
Claritromicina	0,004-0,25
Azitromicina	0,02-0,5
Roxitromicina	0,125-0,25
Quinolonas ²²⁸	
Ciprofloxacino	0,25-4
Ofloxacino	0,5-2
Levofloxacino	0,125-0,5

Tradicionalmente se ha empleado doxiciclina en el tratamiento de las infecciones clamidiales a dosis de 100 mg cada 12 horas durante 14 días o eritromicina 500 mg cuatro veces al día también durante 14 días o 250 mg 4 veces al día un mínimo 3 semanas. Se requieren tratamientos largos porque las recaídas son frecuentes y puede administrarse un segundo ciclo si los síntomas persisten. Ya hemos comentado la capacidad de persistencia de *C. pneumoniae* y la presencia de cultivos positivos a pesar del tratamiento antibiótico prolongado e incluso tras la desaparición de los síntomas clínicos¹³⁷. La eritromicina tiene el inconveniente de su degradación en medio ácido, una vida media relativamente corta y la producción de efectos secundarios gastrointestinales.

Los nuevos macrólidos derivados de la modificación del anillo de lactona de 14 átomos como la claritromicina y roxitromincina, o aumentado los elementos del anillo como la azitromicina, un azólido de 15 átomos, muestran una excelente actividad in vitro,

especialmente la claritromicina frente a *C. pneumoniae*, además de frente a la mayoría de patógenos respiratorios. La eritromicina es muy inestable en el medio ácido del estómago, que disminuye su biodisponibilidad y aumenta su toxicidad. Los nuevos macrólidos también consiguen superar el efecto del PH ácido, son mejor tolerados que la eritromicina y doxiciclina, y gracias a su liposolubilidad, la biodisponibilidad es mayor alcanzando concentraciones tisulares más altas y con semividas más largas, lo que permite su administración en una o dos dosis diarias²³¹. La mejor actividad in vitro bactericida parece obtenerse con la claritromicina mientras que con la azitromicina se consigue la mejor concentración intracelular y duración de la acción, por lo que puede ser administrada en dosis única en el tratamiento de infecciones de transmisión sexual por *C. trachomatis*. Varios estudios han mostrado la eficacia de la claritromicina en el tratamiento de las infecciones por *C. pneumoniae* en dosis de 500-1000 mg/día durante 5-14 días²³². En infecciones respiratorias también se ha observado buena eficacia clínica de azitromicina en tratamientos cortos de 3-5 días, con dosis de 500mg²³³. Así mismo la roxitromicina ha mostrado una eficacia similar a los anteriores en dosis de 150 mg/12 horas durante 10-14 días²³⁴.

En cuanto a las quinolonas hay opiniones contradictorias pero se han comunicado buenos resultados con ofloxacino, 400mg/12 horas, durante 14 días en el tratamiento de bronquitis y neumonía²³⁵.

Parece que los macrólidos son los agentes de elección para el tratamiento de las infecciones respiratorias por *C. pneumoniae* por su elevada concentración en la mucosa bronquial y pulmón además de su excelente actividad in vitro. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica por su unión reversible con la subunidad del ribosoma 50S. Se acumulan dentro de la célula favoreciendo la fagocitosis y la exocitosis de los polimorfonucleares, de esta forma contrarrestan el mecanismo de defensa del

patógeno que inhibe la unión fagolisosómica. También inhiben la producción de oxidantes y modulan la producción de citocinas con posible efecto antiinflamatorio²³⁶. No hay que olvidar que *C. pneumoniae* alterna un estado metabólicamente activo susceptible a los antibióticos, el CR, y otro inactivo resistente a la acción antibiótica, el CE, además de la posible presencia de formas aberrantes inducidas por la exposición a antibióticos o la disminución de nutrientes que pueden establecer una infección persistente¹²³. Un tratamiento corto o incompleto puede inducir persistencia. Además se ha observado la pérdida de la capacidad de la célula infectada en estados avanzados para transportar el macrólido a su interior, quizás por el acúmulo de lipopolisacáridos en la membrana de la célula huésped o por falta de energía¹⁹⁴.

Existe también el problema de la falta de estandarización a la hora de realizar las pruebas de sensibilidad in vitro, con tiempos de preincubación insuficientes y condicionado por el momento de la adición del antibiótico al cultivo celular. Si se añade después de infectar las células del cultivo celular, la CMI y la CMB son ocho veces inferiores a las obtenidas si se añade antes²³⁷. Hjelm y cols²³⁸ incrementaron el tiempo de preincubación de la bacteria hasta 36 horas observando que las CMI y CMB de la azitromicina y otros antibióticos aumentaba. Se ha demostrado la presencia de DNA bacteriano en el pulmón tras 14 días de tratamiento antibiótico con unas concentraciones tisulares superiores a la CMI²³⁹. Otros factores que influyen son el tipo de línea celular, la densidad de la monocapa, la sustancia utilizada para aumentar la sensibilidad del cultivo y el estado nutricional de las células²²⁷.

Actualmente no se han establecido ni las dosis ni la duración más favorable para el tratamiento de las infecciones por *C. pneumoniae* y siguen siendo necesarios unos criterios precisos para la realización e interpretación de las pruebas in vitro que simulen la cinética in vivo y que sean adecuados para predecir la eficacia clínica de los antimicrobianos.

3.8.2. Macrólidos en el tratamiento del asma y la enfermedad cardiovascular.

Los macrólidos además de tener una función antibiótica parecen tener efectos antiinflamatorios que puede ser beneficiosa en el tratamiento de enfermedades con un origen inflamatorio crónico como el asma y la arteriosclerosis (tabla 5).

A finales de los años 50 se observó que la troleandomicina administrada a asmáticos de “origen infeccioso” daba lugar a una disminución en la expectoración y en la necesidad de corticosteroides. Este efecto fue atribuido a una disminución de la depuración de los esteroides por la interacción del macrólido con el citocromo P450 hepático^{240,241}. También se ha encontrado una disminución en la cantidad de esputo y del recuento leucocitario de niños con bronquiectasias tratados con roxitromicina²⁴². Otros autores observaron, tras el tratamiento con macrólidos, disminución del número de neutrófilos en el lavado bronquial y de la concentración de IL- β , IL-8 y leucotrieno B₄²⁴³.

Los macrólidos inhiben la proliferación de las células mononucleares en la sangre, reducen la formación de superóxido in vitro y modifican la liberación de citocinas. También inhiben la secreción mucosa y la contracción del músculo liso bronquial inducida por estimulación eléctrica²⁴⁴. La claritromicina inhibe la síntesis de TNF- α , IL-1, IL1 β , y del factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y estimula la producción de IL-10²⁴⁵. La eritromicina y las nuevas quinolonas disminuyen la depuración de teofilina²⁴⁶.

La mejoría observada en pacientes asmáticos tratados con los nuevos macrólidos (ver apartado 7.*Discusión*) puede derivarse de los efectos antiinflamatorios y antiinfecciosos pero no por su efecto sobre la depuración de los corticosteroides, pues su interacción con el citocromo P450 es escasa o nula.

Dadas las recientes relaciones de *C. pneumoniae* con la formación de la placa de ateroma, la enfermedad coronaria y la isquemia, se ha probado la utilidad de la

azitromicina en pacientes que habían sufrido isquemia cardíaca y tenían serología positiva, observándose una reducción estadísticamente significativa en la incidencia de complicaciones isquémicas posteriores y en el título de anticuerpos²⁴⁷. Un estudio preliminar con roxitromicina frente a placebo en pacientes con enfermedad coronaria demostró la reducción significativa de la incidencia de accidentes isquémicos en el grupo tratado con roxitromicina²⁴⁸.

Aún no se ha podido establecer si hay que incluir a los macrólidos en el tratamiento empírico de las enfermedades que se han relacionado con *C. pneumoniae* y si las mejoras observadas son sostenidas. En el caso de la enfermedad cardiovascular deberían hacerse estudios curativos tras el evento cardiovascular, con el fin hipotético de estabilizar la placa de ateroma así como preventivos para comprobar si podemos evitar su rotura.

Tabla 5. Efectos de los macrólidos.

- 1) Actividad antiinfecciosa frente a patógenos respiratorios intracelulares (*C. pneumoniae*)
- 2) Inhibición de la proliferación de linfocitos mononucleares en sangre periférica
- 3) Disminución de los neutrófilos en el LBA
- 4) Modulación de la liberación de citocinas
- 5) Actividad “antiinflamatoria”:
 - a)-Inhibición de la síntesis del TNF- α , IL-1, GM-CSF, IL-8 y leucotrieno B₄
 - b)-Inhibición de la función oxidativa de los neutrófilos
 - c)-Estímulo de la producción de IL-10
- 6) Disminución de la eliminación de los corticosteroides por interferencia metabólica
- 7) Inhibición de la secreción mucosa
- 8) Inhibición de la contracción neural del musculo liso bronquial.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

4.1. HIPOTESIS.

La infección aguda por *C. pneumoniae* puede provocar crisis asmática en adultos con asma. Los estudios a favor de la existencia de una relación entre ambos factores nos dan porcentajes de pacientes que tienen una exacerbación y a su vez presentan serología compatible con la infección aguda, generalmente comparados con la población no asmática, pero no sabemos si es dicha infección la desencadenante de la crisis. Puesto que en la población general la infección aguda es habitualmente asintomática, o subclínica, también puede ocurrir lo mismo en los pacientes con asma, pero no tenemos datos de la presencia serológica de infección aguda en los asmáticos en situación estable y que pudieran ser también la mayoría. De esta forma los casos de crisis asmática asociados con la presencia de infección aguda por *C. pneumoniae* pueden ser casuales y no existir, por lo tanto, una relación significativa entre ambos factores. Así mismo, y dada la amplia distribución de la infección por *C. pneumoniae*, su seroprevalencia en la población asmática adulta de nuestra zona puede ser coincidente con la esperada en la población general.

Basándonos en lo expresado arriba hemos planteado la siguiente *hipótesis nula*: la frecuencia de infecciones agudas por *C. pneumoniae* en pacientes asmáticos asociadas con crisis asmática no difiere de forma significativa de la frecuencia de infecciones agudas en pacientes asmáticos estables o sin crisis asmática.

Y por lo tanto planteamos como *hipótesis alternativa* lo siguiente: existe una relación significativa entre la presencia de infección aguda por *C. pneumoniae* y el desencadenamiento de la crisis asmática.

4.2. OBJETIVO PRINCIPAL.

Evaluar el papel de la infección aguda por *C. pneumoniae* en el desencadenamiento de la crisis asmática.

4.3. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

1. Conocer los perfiles serológicos y distribución de la infección por *C. pneumoniae* de la población asmática, agudizada y estable, y de la población *general* no asmática de nuestra zona.
2. Determinar si existen diferencias significativas de seroprevalencia y títulos de anticuerpos en cada grupo de asmáticos respecto de la población no asmática.

4.4. OBJETIVOS OPERACIONALES.

1. Determinar las frecuencias de infección aguda, crónica y antigua por *C. pneumoniae* en los tres grupos de estudio y ver si existen diferencias.
2. Conocer si existe un riesgo de asociación entre cada categoría de infección y alguno de los grupos.
3. Conocer si existe relación entre las variables predictores referentes al estado de atopia, tiempo de evolución de la enfermedad y gravedad de la enfermedad asmática de base con los títulos elevados de anticuerpos IgG e IgA.
4. Determinar si también existen diferencias de seroprevalencia respecto a la presencia de títulos elevados de anticuerpos y diferencias en los títulos medios de cada grupo.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1. ESTRATEGIA DE ESTUDIO.

5.1.1. Población objetivo: Sujetos mayores de 14 años diagnosticados de asma según la definición y criterios del National Institute of Health³ (NHLBI): presencia de síntomas asmáticos e hiperreactividad bronquial durante el último año, aumento de la respuesta a los test de histamina o metacolina, variación diurna del PEF $\geq 20\%$ y un aumento del FEV₁ basal $\geq 15\%$ tras la inhalación de broncodilatadores de acción corta.

5.1.2. Emplazamiento: Unidad ambulatoria y de hospitalización de Neumología, Servicio de Urgencias y Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe, pertenecientes al Área 10 de la Comunidad Autónoma de Madrid, en colaboración con el personal de dichas unidades. El número de habitantes que actualmente acoge el Área 10 de la C.A.M se estima en torno a los 250.000 habitantes.

5.1.3. Tipo de estudio: descriptivo, de casos y controles, prospectivo y con muestras aleatorias simples.

5.1.4. Sujetos de Estudio:

Asmáticos: i) Pacientes adultos que presentan síntomas de crisis asmática según la definición del NHBLI³: episodios de disnea con empeoramiento progresivo, tos, sibilancias u opresión torácica acompañados de la disminución del PEF o FEV₁.

- ii) Pacientes asmáticos en situación estable o asintomática cuya última crisis ocurrió hace más de 1 mes.

No asmáticos: población *general* no asmática del Área 10 de la Comunidad de Madrid.

5.1.5. Periodo de entrada de los pacientes en el estudio: Desde el 1 de diciembre de 1997 hasta el 31 de diciembre de 1998.

5.1.6. Variables de estudio.

5.1.6.1.: V. Predictoras o independientes:

5.1.6.1.1.: Grupo de estudio: agudos, estables, general.

5.1.6.1.2.: Enfermedad asmática de base según clasificación del NHLBI³:

intermitente, persistente leve, persistente moderado, persistente grave.

5.1.6.1.3.: Tiempo de evolución de la enfermedad asmática: larga-duración o > 10 años, corta-duración o de 1-10 años y reciente o < 1 año.

5.1.6.1.4.: Clasificación respecto al estado de atopia: intrínseco o extrínseco.

5.1.6.1.5.: Edad, sexo, hábito tabáquico (fumador, ex fumador, no fumador).

5.1.6.2.: V. Dependientes o de criterio (según criterios serológicos establecidos):

5.1.6.2.1.: Tipo de infección: aguda, crónica, antigua y no infección

5.1.6.2.2.: cuantitativas: títulos y MGTs de IgG, IgM, IgA.

5.1.7. Recogida de datos.

Asmáticos: Se procedió a cumplimentar las hojas de recogida de datos adjuntas (veanse a continuación Anexos 1 y 2) según la historia clínica del paciente y los datos recogidos durante la visita médica a la consulta o Servicio de Urgencias, y se extrajeron muestras de sangre en ambos grupos de pacientes. Los pacientes reagudizados, tras su

estabilización, fueron vistos en la consulta de Neumología a las 4 semanas para su seguimiento y extracción de una segunda muestra de suero. Así mismo los pacientes fueron llamados a las 4 semanas para realizar la segunda extracción. Para la inclusión en el estudio se exigió el consentimiento informado de los pacientes (vease Anexo 3).

No asmáticos: la población no asmática se obtuvo de población de donantes de sangre que acudían cada día al banco de sangre a los que se entrevistaba por teléfono para conocer los datos referentes a la edad, sexo, hábito de fumador, alergias, hipertensión arterial, enfermedades respiratorias, alteraciones cardiológicas y antecedentes de infección respiratoria en el último mes.

5.1.8. Detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos.

La detección de anticuerpos se hizo mediante microinmunofluorescencia indirecta y se llevó a cabo en el laboratorio de serología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe. Se utilizaron los kits comerciales de MRL Diagnóstics Chlamydia MIF IgG, IgA e IgM Assay, que contenían los portaobjetos con el sustrato preparado a base de CEs purificados de *C. pneumoniae* (TW 183), *C. trachomatis* (D-K) y *C. psittaci* (6BC, DD34) diluidos al 3% en células de saco vitelino, así como el resto de reactivos necesarios. Para valorar la presencia de reacciones cruzadas se realizó la detección de anticuerpos frente a *C. trachomatis* y *C. psittaci* al mismo tiempo que para *C. pneumoniae*. Para evitar interferencias en la detección de IgM con el anticuerpo factor reumatoide, los sueros fueron tratados previamente con un suero absorbente anti-IgG. Se utilizaron como controles sueros positivos y negativos además de células de saco vitelino normales como control negativo del antígeno.

En una primera fase se diluía la muestra serológica en un tampón fosfato (PBS) y se añadía al portaobjetos, en contacto con el antígeno clamidial, para ser incubados en cámara

humeda a 35°C durante 30 minutos en el caso de la detección de IgG e IgA, y 90 minutos para IgM y permitir así la formación de los inmunocomplejos. Después los portaobjetos eran lavados en un tampón salino para retirar los anticuerpos que no se habían unido al antígeno y secados. En una segunda fase se añadía a los portaobjetos el reactivo correspondiente que contenía los anticuerpos anti-IgG, IgA o IgM humana marcados con fluoresceína y se incubaban otros 30 minutos. Tras un segundo lavado con tampón salino y secado, los portaobjetos eran montados para su examen en el microscopio de fluorescencia. Una reacción positiva aparecía como una fluorescencia verde brillante sobre la matriz de células de saco vitelino. Se emplearon los criterios de diagnóstico serológico establecidos en la literatura (ver apartado 3.7.3 *Diagnóstico serológico:..*) y expuestos en la tabla 6. Los puntos de corte semicuantitativos se obtenían mediante diluciones seriadas de los sueros positivos

Tabla 6. Criterios serológicos utilizados para el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae* por Microinmunofluorescencia indirecta.

Infección aguda	
Primoinfección	IgM \geq 1:10 IgG \geq 512 Seroconversión de IgG (Incremento del título de IgG por 4)
Reinfección o reactivación	IgG \geq 512 +/- IgA \geq 1:256 Seroconversión de IgG y/o IgA (x 4) Ausencia de IgM.
Infección antigua	IgG \geq 1:16 < 1:512 y/o
Infección crónica	IgA \geq 1:16 < 1:256

ANEXO 1.
HOJA DE RECOGIDA DE DATOS 1.
CHLAMYDIA PNEUMONIAE Y CRISIS ASMÁTICA

FECHA:...../...../.....

PACIENTE N°:.....; **AGUDOS**

APELLIDOS:.....Hª CLINICA:.....

NOMBRE:.....EDAD:..... SEXO: o V o

RESIDENCIA:..... TF:.....

HA SIDO FUMADOR/A: o SI ¿De cuánto?.....; o NO

INICIO EN LA INFANCIA o.....años; INICIO ADULTO o.....años; CARDIOPATA o SI o NO

CLASIFICACIÓN

Alérgica o Ocupacional o Por ejercicio o Tras infección respiratoria aguda o Desconocido o

LEVE (síntomas < 1 por semana) : o

PERSISTENTE :

a) Leve (síntomas >= 1 vez por semana pero no diarios): o

b) Moderada (diarios no limitantes):..... o

c) Severa (contínuos, limitantes) : o

Corticoides : o SI < 500 mcg/día
o SI >= 800-2000 mcg/día.
o NO

Broncodilatadores de acción corta: < de 1-3 veces/semana; o; < 3-4 veces/día; o >3-4/día o

Broncodilatadores de acción larga o SI o NO

PEF previsto:.....%, ó , l/min

CRISIS ASMÁTICA ACTUAL

-Respuesta al tratamiento inicial con B₂ inhalados:..... o

-Respuesta inicial incompleta. Necesario corticoides orales:. o

-Ingreso:..... o

Otros datos:

Tª:.....; FR:.....rpm; FC:.....lpm; PEF:.....% , ó ,l/min.

PO₂:.....mmHg; PCO₂:.....; SaO₂:%

Infiltrado RX: o SI o NO Expectoración : o SI o NO

SEROLOGIA

IgG>= 512 o; IgG>= 64 < 512 o; Elevación al cuadruplo o 1ª.....; 2ª.....; IgG< 64 o

IgA>= 256 o; IgA>= 16 < 256;

IgM \geq 16 en la 1ª muestra ; IgM \geq 16 en la 2ª muestra ; IgM negativa

ANEXO 2
HOJA DE RECOGIDA DE DATOS 2
CHLAMYDIA PNEUMONIAE Y CRISIS ASMÁTICA

FECHA:../../.....

PACIENTE N°:.....; **ESTABLES**

APELLIDOS:.....Hª CLINICA:.....

NOMBRE:.....EDAD:..... SEXO: V

RESIDENCIA:..... TF:.....

HA SIDO FUMADOR/A: SI ¿De cuánto?.....; NO

INICIO EN LA INFANCIA o.....años; INICIO ADULTO o.....años; CARDIOPATA SI NO

CLASIFICACIÓN

Alérgica Ocupacional Por ejercicio Tras infección respiratoria aguda Desconocido

LEVE (síntomas < 1 por semana) :

PERSISTENTE :

a) Leve (síntomas \geq 1 vez por semana pero no diarios):

b) Moderada (diarios no limitantes):.....

c) Severa (contínuos, limitantes) :

Corticoides : SI < 500 mcg/día
 SI \geq 800-2000 mcg/día.
 NO

Broncodilatadores de acción corta: < de 1-3 veces/semana; < 3-4 veces/día; >3-4/día

Broncodilatadores de acción larga SI NO

PEF previsto:.....%, ó , l/min

SEROLOGIA

IgG \geq 512 ; IgG = 16-256 ; Elevación al cuádruplo 1ª.....; 2ª.....; IgG< 16

IgA \geq 256 ; IgA = 16-128; IgA < 16

IgM \geq 16 en la 1ª muestra ; IgM \geq 16 en la 2ª muestra ; IgM negativa

ANEXO 3

ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* EN PACIENTES ASMÁTICOS.

CONSENTIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE SANGRE

Paciente: **D./D^a**
de.....años de edad da su consentimiento para la extracción de dos muestra de sangre venosa, separadas por un intervalo de 4 semanas, declarándose informado de los siguientes puntos:

La extracción de sangre venosa se efectúa para la determinación de anticuerpos de la infección por *Chlamydia pneumoniae*, bacteria implicada en infecciones respiratorias, siendo necesario para realizar y confirmar el diagnóstico, las extracciones arriba mencionadas. El presente estudio pretende conocer la relación entre dicha infección y la enfermedad asmática.

La mayoría de los pacientes sometidos a la extracción no experimentan ninguna complicación, salvo y de forma excepcional, ligeras molestias en zona de la punción o la aparición de un pequeño hematoma que puede resolverse con la aplicación, en la zona, de una crema antitrombótica (Hirudoid o Thrombocid).

Getafe (Madrid),de.....199...

FIRMA DEL PACIENTE:

.....

o FIRMA DEL FAMILIAR RESPONSABLE

(PARENTESCO).....

.....

o en su defecto, TESTIGO o TUTOR:

.....

5.2. DISEÑO ESTADÍSTICO.

Se estimó que para observar en cada grupo una proporción semejante de infección aguda por *C. pneumoniae*, con una probabilidad de rechazar incorrectamente la *hipótesis nula* o nivel de significación del 5% ($p < 0.05$) y con un poder estadístico del 80%, se necesitaban al menos 56 individuos por grupo.

Se recogieron las frecuencias de aparición (absolutas y relativas) de las variables cualitativas, así como de las categorías de cada carácter. Para hallar los índices estadísticos que midieron la fuerza de la asociación entre las variables, los datos se recogieron en tablas de contingencia. Para comparar proporciones se utilizó el test Chi cuadrado (χ^2), o suma de diferencias cuadráticas relativas entre los valores experimentales y los esperados. Cuando se trataba de una tabla 2x2 cuyo efectivo total no llegaba a 200 individuos se aplicó la corrección de continuidad de Yates, para aumentar el rigor de la prueba. Para aumentar la exactitud de la prueba χ^2 cuando la frecuencia observada en alguna de las celdas de la tabla era inferior a 5 se aplicó el test exacto de Fisher^{249,250}.

La medida del aumento del riesgo, razón de riesgos o diferencia entre proporciones (si las hubo), de cada población para presentar cada categoría de infección o para tener títulos altos de anticuerpos, se calculó mediante la razón de probabilidad u “odds ratio” (OR). Se aplicaron intervalos o límites de confianza con un nivel de significación del 5% ($p < 0.05$), o dicho de otro modo, los intervalos de confianza utilizados contenían el valor obtenido con una probabilidad del 95%. No podemos aplicar el riesgo relativo o cociente de riesgo, ya que es un cociente de las incidencias en los expuestos y no expuestos y estas no pueden ser estimadas en un estudio caso-control²⁵⁰. También calculamos el riesgo atribuible o la proporción de casos de crisis en la población total que pueden atribuirse al factor de riesgo, infección aguda. Igualmente se aplicaron unos límites de confianza con un nivel de significación del 5%.

Para eliminar el efecto de variables de confusión como la edad, el sexo y el hábito tabáquico sobre el aumento del riesgo, se ajustaron los datos mediante un análisis de regresión múltiple. De esta forma se expresa el valor medio de la variable dependiente en términos de los valores de las variables de confusión llamadas independientes²⁵⁰.

Se calculó la media aritmética de los valores de variables cuantitativas continuas como la edad, y la desviación típica o estándar como medida de dispersión de los valores respecto a la media. También se expresaron los límites superior e inferior de los valores.

En el caso de variables cuantitativas discretas o de intervalo como era el caso de las concentraciones de IgG, IgA e IgM, se calculó la *media geométrica* (MGT) de los títulos. Para determinar la MGT se utilizaron los logaritmos de los títulos y se halló la media aritmética del logaritmo, u , que también se mide en una escala logarítmica como los valores individuales. Para volver a la escala original de los títulos hallamos el antilogaritmo de u , el cual se denomina media geométrica. Se calcularon los límites de confianza de la MGT con un nivel de significación del 5%. Otras medidas de tendencia central utilizadas para la distribución de títulos de anticuerpos fueron la moda o valor que se repite con más frecuencia y la mediana o valor central de las observaciones dispuestas en orden creciente. También se expresaron los valores extremos o límites de los títulos para las variables IgG e IgA y la amplitud intercuartílica, IQR, que mide la distancia entre el valor por debajo del cual se encuentra un cuarto de las observaciones ordenadas, o el 25%, denominado cuartil inferior o percentil 25, y el cuartil superior o valor por encima del cual se encuentra un cuarto de las observaciones (el 75% queda por debajo) o percentil 75. En el IQR se encuentra el 50% de las observaciones y no le afectan los valores extremos. Para determinar si las diferencias entre medias eran significativas, lo que se denomina estudio de la homogeneidad entre dos muestras²⁴⁹, se utilizó el test de la t de Student (t -Test). Si se trataba de 3 muestras, utilizamos el análisis de la varianza (media cuadrática de las

puntuaciones diferenciales de todo los datos con su media) o Anova, con el que se calcula la razón de varianzas, o F de Snedecor. Si el valor de F indicaba la presencia de diferencias significativas se realizaba el contraste de medias dos a dos mediante el test de Tukey.

La distribución de probabilidad más importante para variables aleatorias continuas se denomina distribución normal o de Gauss, caracterizada por una distribución de frecuencias en forma acampanada, con un pico medio pronunciado en el centro y una disminución gradual de las frecuencias a medida que se alejan del valor central. Gran parte de las variables biológica se distribuyen siguiendo la normal (de media 0, desviación típica 1), pero a veces las distribuciones puede que no se ajusten a la curva acampanada^{249,250}. Esto sucede en los problemas de diferencias de medias con variables ordinales, como los títulos de anticuerpos y sus medias geométricas, o cuando los tamaños de las muestras son muy pequeños. Para comprobar si la distribución de las variables IgG e IgA seguían la distribución normal se utilizó la prueba K-S de normalidad o test de Kolmogorov-Smirnov. Puesto que ambas distribuciones no se ajustaban a la normalidad, utilizamos pruebas no paramétricas para comparar las MGTs. Las pruebas no paramétricas miden las diferencias entre los rangos medios de variables ordenadas por rangos. Son pruebas bastante robustas, o poco sensibles a la no normalidad, y por lo tanto las probabilidades asociadas con los contrastes estadísticos son correctas. Para comparar las MGTs de dos muestras no relacionadas empleamos la prueba de la U de Mann-Whitney, que es la prueba paralela a la t de Student. Si se trataba de tres muestras no relacionadas utilizamos el Anova de Kruskal-Wallis, que es la prueba no paramétrica paralela al análisis de la varianza²⁵⁰.

Los trabajos estadísticos se realizaron con los paquetes estadísticos SAS Institute Inc y SPSS version 9.0 junto con la hoja de cálculo Microsoft Excel/ Windows 95.

En la preparación del manuscrito se siguieron los requisitos técnicos recomendados por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas.

6. RESULTADOS

Se evaluaron un total de 242 sujetos de los que 128 correspondían a pacientes asmáticos, divididos en grupo *agudos* y grupo *estables*, y 114 a no asmáticos o grupo *general*. El grupo *general* se componía de 56 sujetos donantes de sangre y 58 pacientes que habían acudido a consultas externas o estaban ingresados en el hospital pero que no presentaban cardiopatías o enfermedades respiratorias y a los que se les habían realizado extracciones sanguíneas por causas no relacionadas con el objeto del estudio. Las características de las poblaciones se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Características demográficas de las tres poblaciones estudiadas.

	<i>Agudos</i> n=65	<i>Estables</i> n=63	<i>General</i> n=114	
Edad				
Media (Sd)	49.4(19.3)*	42.7 (18.7)	39 (17.8)*	p<0.01*
Límites	15-87	15-81	14-85	
Sexo (%)				
Mujer	49 (75.3)	41 (65)	60 (52.6)	p<0.05**
Hombre	16 (24.6)	22 (34.9)	54 (47.3)	
Tabaquismo (%)				
Fumadores	12 (18.4)	13 (20.6)	25 (21.9)	n.s.
Ex-Fumadores	11 (16.9)	5 (7.9)	19 (16.6)	n.s.
No Fumadores	42 (64.6)	45 (71.4)	70 (61.4)	n.s.
Hta ajustada a edad	17	11	14	n.s.
Diabetes méllitus	0	5	1	
Cardiopatía	1	1	0	

Sd: desviación típica o estandar; Hta: hipertensión arterial; n.s.: no significativo (p>0.05)

*ANOVA (F) =6.53 con 2 gl; p=0.001; Test de Tukey *agudos-general* p<0.05.

** χ^2 =5.23 con 1 gl; p=0.022.

La media de edad del grupo *agudos* fue superior a la media del grupo *general*. Esta diferencia de medias es de carácter matemático y no interfiere en la distribución de las variables serológicas estudiadas.

Con respecto a la distribución de sexos, la presencia de mujeres fue superior a la de hombres en las tres poblaciones pero especialmente en los colectivos asmáticos. No se detectaron diferencias significativas entre la frecuencia de seropositivos ($\text{IgG} \geq 1:16$) en hombres y en mujeres ($\chi^2 = 1.26$ $p=0.12$). La media geométrica de los títulos (MGT) de IgG fue mayor en el conjunto de hombres (MGT 158.4 IC 95% 125.8-199.5) respecto al conjunto de mujeres (MGT 125.8, IC 95% 102-151.3), pero la diferencia no pudo ser considerada significativa (t -Test $= -2.29$ $p=0.065$; U de Mann Whitney $p=0.064$).

También se observó una diferencia en principio significativa, ($\chi^2 = 7.58$ $p=0.006$; OR 4.6 IC 95% 1.3-14.6) a favor de una mayor presencia de hipertensión arterial en el conjunto de asmáticos, que desapareció tras el ajuste por edad ($p > 0.05$; OR 0.9).

Los datos recogidos de cada población se encuentran resumidos en las tablas 8, 9 y 10.

RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA POBLACIÓN

Tabla 8. Grupo Agudos

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	Clasificación	Tiempo	Severidad	Crisis	Inf Rx	Tª °C	IgG1	IgG	IgA1	IgA2	Infección
1 A	varón	24	ex-fumador	intrínseca	< 1 año	p. leve	moderada	si	38	1024	1024	256	64	aguda
2 A	mujer	42	ex-fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	moderada	no	36	16	16	0	0	antigua
3 A	mujer	41	ex-fumador	intrínseca	1-10 años	p.grave	grave	no	36,8	0	0	0	0	no infección
4 A	mujer	27	ex-fumador	intrínseca	1-10 años	p.grave	grave	no	37	32	32	0	0	antigua
5 A	varón	45	no fumador	intrínseca	> 10 años	p. moderada	grave	no	37	256	256	0	0	antigua
6 A	varón	39	ex-fumador	intrínseca	>10 años	p. moderada	grave	no	37,5	1024	4096	0	0	aguda
7 A	mujer	69	no fumador	extrínseca	> 10 años	p. moderada	grave	no	37	64	64	0	0	antigua
8 A	mujer	59	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	no	37,2	256	256	64	64	crónica
9 A	mujer	48	ex-fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	grave	no	39	16	16	0	0	antigua
10 A	varón	19	fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	moderada	no	39	256	256	0	0	antigua
11 A	mujer	58	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	si	39	0	0	0	0	no infección
12 A	varón	48	fumador	intrínseca	>10 años	corticodependiente	grave	no	37,2	128	128	64	64	crónica
13 A	mujer	76	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	no	37,5	128	128	64	64	crónica
14 A	mujer	24	fumador	extrínseca	>10 años	p.leve	moderada	no	39	128	128	32	32	crónica
15 A	varón	73	fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	si	36,6	512	512	0	0	aguda
16 A	mujer	41	fumador	intrínseca	1-10 años	p.grave	grave	si	37,5	0	0	0	0	no infección
17 A	mujer	44	no fumador	extrínseca	> 10 años	p. moderada	grave	no	37,7	128	128	0	0	antigua
18 A	mujer	68	no fumador	intrínseca	1-10 años	intermitente	moderada	no	0	64	64	0	0	antigua
19 A	varón	23	fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	grave	no	0	128	128	0	0	antigua
20 A	mujer	74	fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	grave	no	0	64	64	0	0	antigua
21 A	mujer	73	no fumador	intrínseca	> 10 años	p. moderada	grave	si	0	64	64	32	32	crónica
22 A	mujer	78	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	si	38	1024	1024	512	128	aguda
23 A	mujer	31	fumador	extrínseca	1-10 años	p. moderada	grave	no	38	64	64	0	0	antigua
24 A	mujer	43	no fumador	intrínseca	> 10 años	intermitente	grave	no	37,2	512	512	0	0	aguda
25 A	varón	22	no fumador	extrínseca	1-10 años	p. moderada	moderada	no	37,2	64	64	0	0	antigua

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	Clasificación	Tiempo	Severidad	Crisis	Inf Rx	Tª °C	IgG1	IgG	IgA1	IgA2	Infección
26 A	mujer	74	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	no	38	32	32	0	0	antigua
27 A	mujer	41	fumador	intrínseca	>10 años	p.leve	grave	no	37,5	128	128	0	0	antigua
28 A	mujer	80	no fumador	intrínseca	> 10 años	p. moderada	moderada	no	36,2	64	64	16	16	crónica
29 A	mujer	66	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	no	38	64	64	0	0	antigua
30 A	mujer	16	no fumador	extrínseca	1-10 años	p.grave	moderada	no	0	64	64	0	0	antigua
31 A	mujer	55	no fumador	extrínseca	> 10 años	p.leve	moderada	no	36	32	32	0	0	antigua
32 A	mujer	51	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	grave	no	37	128	128	32	32	crónica
33 A	varón	34	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.leve	grave	no	37,2	64	64	0	0	antigua
34 A	mujer	25	no fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	moderada	si	37	32	32	0	0	antigua
35 A	mujer	61	no fumador	extrínseca	< 1 año	p. moderada	grave	no	36,7	64	64	0	0	antigua
36 A	varón	42	ex-fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	grave	no	37	128	128	64	64	crónica
37 A	mujer	41	ex-fumador	extrínseca	1-10 años	p. moderada	grave	no	36,8	16	16			antigua
38 A	mujer	66	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.grave	grave	no	37,7	0	0	0	0	no infección
39 A	varón	65	no fumador	extrínseca	>10 años	p. moderada	grave	no	0	128	128	0	0	antigua
40 A	varón	18	no fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	grave	no	36,6	128	128	0	0	antigua
41 A	mujer	77	no fumador	intrínseca	>10 años	p.grave	grave	no	0	16	16	0	0	antigua
42 A	mujer	78	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	si	36,5	128	128	64	64	crónica
43 A	mujer	87	no fumador	intrínseca	>10 años	intermitente	grave	no	37,3	16	16	0	0	antigua
44 A	mujer	61	no fumador	intrínseca	>10 años	p.grave	moderada	no	36,7	128	128	0	0	antigua
45 A	mujer	72	no fumador	intrínseca	> 10 años	corticodependiente	grave	no	0	0	0	0	0	no infección
46 A	mujer	51	no fumador	intrínseca	< 1 año	p.leve	grave	no	0	128	128	0	0	antigua
47 A	mujer	44	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.leve	grave	si	37,7	32	32	0	0	antigua
48 A	varón	53	fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	grave	no	0	16	16	0	0	antigua
49 A	mujer	47	no fumador	extrínseca	1-10 años	p. moderada	moderada	no	36,8	128	128	64	64	crónica
50 A	varón	25	fumador	extrínseca	>10 años	p. moderada	moderada	no	37,3	0	0	0	0	no infección
51 A	mujer	66	no fumador	intrínseca	1-10 años	p. moderada	moderada	no	0	0	0	0	0	no infección
52 A	mujer	42	no fumador	extrínseca	>10 años	intermitente	grave	no	36,8	1024	1024	0	0	aguda
53 A	mujer	75	no fumador	intrínseca	< 1 año	p.leve	grave	no	38,5	1024	1024	512	512	aguda
54 A	varón	49	no fumador	intrínseca	>10 años	p. moderada	grave	no	0	2048	2048	512	256	aguda

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	Clasificación	Tiempo	Severidad	Crisis	Inf Rx	Tª °C	IgG1	IgG	IgA1	IgA2	Infección
55 A	mujer	50	no fumador	intrínseca	> 10 años	p.grave	grave	no	37,5	1024	1024	0	0	aguda
56 A	mujer	26	ex-fumador	intrínseca	< 1 año	p. moderada	leve	no	0	0	0	0	0	no infección
57 A	mujer	15	no fumador	intrínseca	< 1 año	p.leve	leve	no	0	512	512	0	0	aguda
58 A	mujer	44	no fumador	intrínseca	< 1 año	p.leve	grave	no	0	128	128	64	64	crónica
59 A	mujer	55	no fumador	intrínseca	>10 años	p.grave	moderada	no	0	64	64	0	0	antigua
60 A	mujer	39	ex-fumador	intrínseca	>10 años	corticoddependiente	leve	no	0	0	0	0	0	no infección
61 A	mujer	75	no fumador	intrínseca	> 10 años	p. moderada	leve	no	0	256	256	32	32	crónica
62 A	mujer	48	no fumador	intrínseca	>10 años	corticoddependiente	grave	no	0	64	128	16	16	crónica
63 A	mujer	24	fumador	extrínseca	>10 años	p. moderada	leve	no	0	128	128	0	0	antigua
64 A	varón	63	no fumador	extrínseca	> 10 años	p. moderada	leve	no	0	256	256	0	0	antigua
65 A	mujer	22	ex-fumador	extrínseca	>10 años	p. moderada	leve	no	0	1024	1024	0	0	aguda

<1 año: reciente; 1-10 años:cortaduración; >10 años: largaduración. IgG1 e IgA1: 1ª muestra de suero. IgG2 e IgA2: 2ª muestra de suero después de 4 semanas.

Tabla 9. Grupo Estables

Clay	Sexo	Edad	Tabaquismo	Clasificación	Tiempo	Severidad	Meses estable	IgG1	IgG2	IgA1	IgA2	Infección
1 E	varón	46	fumador	intrínseca	1-10 años	p.grave	2	64	64	0	0	antigua
2 E	varón	67	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	3	128	128	32	32	crónica
3 E	mujer	18	no fumador	extrínseca	1-10 años	p.moderada	3	64	64	0	0	antigua
4 E	mujer	58	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	3	256	256	0	0	antigua
5 E	mujer	22	fumador	extrínseca	>10 años	p.moderada	4	32	32	0	0	antigua
6 E	mujer	30	fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	6	128	128	16	16	crónica
7 E	varón	30	no fumador	intrínseca	>10 años	p.grave	3	128	128	0	0	antigua
8 E	varón	62	no fumador	intrínseca	>10 años	p.grave	6	1024	1024	128	128	crónica
9 E	mujer	65	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	128	128	32	32	crónica
10 E	mujer	46	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	2	128	128	0	0	antigua
11 E	varón	19	no fumador	extrínseca	>10 años	p.moderada	12	0	0	0	0	no infección
12 E	varón	19	fumador	extrínseca	>10 años	intermitente	2	512	512	0	0	aguda
13 E	mujer	55	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	2	0	0	0	0	no infección

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	Clasificación	Tiempo	Severidad	Meses estable	IgG1	IgG2	IgA1	IgA2	Infección
14 E	varón	55	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	0	0	0	0	no infección
15 E	varón	25	fumador	extrínseca	<1 año	p.leve	2	256	128	0	0	no infección
16 E	varón	18	no fumador	extrínseca	>10 años	p.moderada	3	128	128	16	16	crónica
17 E	mujer	47	no fumador	intrínseca	>10 años	p.leve	6	128	128	0	0	antigua
18 E	mujer	51	no fumador	intrínseca	1-10 años	intermitente	2	0	0	0	0	no infección
19 E	mujer	27	no fumador	extrínseca	>10 años	p.moderada	2	128	64	32	32	crónica
20 E	mujer	47	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	12	128	128	0	0	antigua
21 E	varón	57	no fumador	extrínseca	>10 años	p.grave	6	0	0	0	0	no infección
22 E	mujer	66	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	0	0	0	0	no infección
23 E	mujer	44	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	6	0	0	0	0	no infección
24 E	mujer	39	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	3	64	64	0	0	antigua
25 E	mujer	46	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	0	0	0	0	no infección
26 E	mujer	37	ex-fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	3	128	128	0	0	antigua
27 E	mujer	74	no fumador	intrínseca	>10 años	p.leve	6	256	256	0	0	antigua
28 E	mujer	74	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	3	0	0	0	0	no infección
29 E	varón	33	no fumador	intrínseca	<1 año	intermitente	2	128	128	0	0	antigua
30 E	varón	50	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	64	64	0	0	antigua
31 E	mujer	67	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	2	0	0	0	0	no infección
32 E	mujer	64	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	6	32	32	0	0	antigua
33 E	mujer	40	no fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	3	0	0	0	0	no infección
34 E	mujer	21	fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	3	0	0	0	0	no infección
35 E	varón	48	no fumador	intrínseca	<1 año	p.leve	2	128	128	64	64	crónica
36 E	varón	17	no fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	6	64	64	0	0	antigua
37 E	mujer	70	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.grave	6	128	128	32	32	crónica
38 E	mujer	58	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	6	128	128	16	16	crónica
39 E	mujer	19	ex-fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	6	256	256	16	16	crónica
40 E	mujer	21	fumador	extrínseca	1-10 años	p.leve	3	0	0	0	0	no infección
41 E	mujer	26	fumador	extrínseca	<1 año	p.leve	3	1024	1024	16	16	crónica
42 E	mujer	25	no fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	6	16	16	0	0	antigua

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	Clasificación	Tiempo	Severidad	Meses estable	IgG1	IgG2	IgA1	IgA2	Infección
43 E	mujer	25	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	2	128	128	0	0	antigua
44 E	varón	23	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	3	64	64	0	0	antigua
45 E	varón	81	ex-fumador	extrínseca	>10 años	p.grave	6	16	16	0	0	antigua
46 E	mujer	59	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	3	0	0	0	0	no infección
47 E	mujer	15	no fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	3	32	32	0	0	antigua
48 E	varón	24	ex-fumador	extrínseca	1-10 años	intermitente	6	64	64	0	0	antigua
49 E	mujer	45	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	2	0	0	0	0	no infección
50 E	mujer	32	fumador	intrínseca	1-10 años	p.moderada	2	128	128	32	32	crónica
51 E	mujer	25	fumador	extrínseca	>10 años	p.moderada	3	128	128	0	0	antigua
52 E	varón	58	no fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	128	128	0	0	antigua
53 E	mujer	59	no fumador	extrínseca	>10 años	p.grave	2	64	64	32	32	crónica
54 E	mujer	22	fumador	intrínseca	<1 año	intermitente	3	512	512	0	0	aguda
55 E	varón	15	no fumador	extrínseca	>10 años	p.moderada	3	128	128	0	0	antigua
56 E	mujer	24	no fumador	intrínseca	<1 año	p.leve	7	512	512	64	64	crónica
57 E	varón	77	fumador	intrínseca	>10 años	p.leve	6	512	512	128	128	crónica
58 E	mujer	50	no fumador	extrínseca	1-10 años	p.leve	2	256	256	32	32	crónica
59 E	varón	35	fumador	intrínseca	<1 año	p.grave	2	1024	1024	64	64	crónica
60 E	mujer	51	no fumador	intrínseca	<1 año	p.leve	6	0	0	0	0	no infección
61 E	varón	52	ex-fumador	intrínseca	>10 años	p.moderada	6	64	64	0	0	antigua
62 E	mujer	44	no fumador	intrínseca	1-10 años	p.leve	6	0	0	0	0	no infección
63 E	mujer	72	no fumador	intrínseca	>10 años	p.leve	6	256	256	0	0	antigua

<1 año: reciente; 1-10 años: cortaduración; > 10 años: largaduración. IgG1 e IgA: 1ª muestra de suero. IgG2 e IgA2: 2ª muestra de suero después de 4 semanas.

Tabla 10. Grupo *General*

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	IgG	IgA	IgM	Infección
1 G	mujer	30	no fumador	1024	32	0	crónica
2 G	varón	33	fumador	512	64	0	crónica

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	IgG	IgA	IgM	Infección
3 G	varón	37	fumador	0	0	0	no infección
4 G	varón	21	no fumador	256	64	0	crónica
5 G	varón	20	no fumador	128	0	0	antigua
6 G	varón	42	ex-fumador	256	64	0	crónica
7 G	varón	26	no fumador	128	64	0	crónica
8 G	varón	24	no fumador	64	16	0	crónica
9 G	varón	24	no fumador	0	0	0	no infección
10 G	varón	55	ex-fumador	32	0	0	antigua
11 G	varón	33	ex-fumador	128	64	0	crónica
12 G	mujer	22	no fumador	32	0	0	antigua
13 G	varón	46	fumador	2048	128	0	crónica
14 G	varón	53	no fumador	256	0	0	antigua
15 G	varón	39	no fumador	64	0	0	antigua
16 G	mujer	31	fumador	32	0	0	antigua
17 G	mujer	35	fumador	64	32	0	crónica
18 G	mujer	30	no fumador	512	32	0	crónica
19 G	mujer	52	no fumador	0	0	0	no infección
20 G	mujer	53	no fumador	128	64	0	crónica
21 G	mujer	59	no fumador	0	0	0	no infección
22 G	varón	32	fumador	32	0	0	antigua
23 G	mujer	24	no fumador	64	0	0	antigua
24 G	varón	24	no fumador	128	16	0	crónica
25 G	varón	19	no fumador	0	0	0	no infección
26 G	varón	20	no fumador	128	64	0	crónica
27 G	varón	23	no fumador	128	16	0	crónica
28 G	varón	24	no fumador	64	0	0	antigua
29 G	mujer	24	no fumador	128	16	0	crónica
30 G	varón	22	no fumador	0	0	0	no infección
31 G	mujer	62	no fumador	16	0	10	aguda

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	IgG	IgA	IgM	Infección
32 G	varón	30	no fumador	64	0	0	antigua
33 G	varón	25	no fumador	32	0	0	antigua
34 G	mujer	18	no fumador	256	0	0	antigua
35 G	mujer	39	no fumador	128	0	0	no infección
36 G	varón	45	no fumador	512	128	0	crónica
37 G	varón	42	no fumador	64	0	0	antigua
38 G	varón	22	no fumador	0	0	10	aguda
39 G	mujer	44	no fumador	64	0	0	antigua
40 G	varón	44	no fumador	32	0	0	antigua
41 G	mujer	47	ex-fumador	32	0	10	aguda
42 G	varón	32	no fumador	512	0	0	aguda
43 G	mujer	20	no fumador	0	0	0	no infección
44 G	varón	24	fumador	64	0	0	antigua
45 G	mujer	39	no fumador	2048	0	0	aguda
46 G	mujer	50	ex-fumador	64	0	0	antigua
47 G	varón	29	ex-fumador	64	0	0	antigua
48 G	varón	39	ex-fumador	64	16	0	crónica
49 G	varón	29	no fumador	128	64	0	crónica
50 G	varón	37	ex-fumador	64	16	0	antigua
51 G	varón	35	ex-fumador	512	0	10	aguda
52 G	mujer	25	no fumador	256	32	0	crónica
53 G	mujer	22	no fumador	64	0	0	antigua
54 G	mujer	18	no fumador	256	16	0	crónica
55 G	mujer	20	no fumador	128	16	0	crónica
56 G	mujer	20	fumador	128	0	0	antigua
57 G	mujer	79	no fumador	128	16	0	crónica
58 G	mujer	84	no fumador	512	0	0	aguda
59 G	mujer	61	no fumador	0	0	0	no infección
60 G	varón	74	ex-fumador	512	256	0	aguda

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	IgG	IgA	IgM	Infección
61 G	mujer	85	no fumador	128	0	0	antigua
62 G	varón	64	ex-fumador	1024	0	0	aguda
63 G	mujer	15	no fumador	0	0	0	no infección
64 G	varón	46	fumador	512	128	0	crónica
65 G	mujer	29	no fumador	0	0	0	no infección
66 G	mujer	23	fumador	256	0	0	antigua
67 G	mujer	30	no fumador	256	0	0	antigua
68 G	mujer	78	no fumador	0	0	0	no infección
69 G	varón	73	fumador	256	0	0	antigua
70 G	varón	17	no fumador	1024	64	0	crónica
71 G	varón	14	no fumador	64	0	0	antigua
72 G	varón	16	no fumador	512	0	0	aguda
73 G	varón	73	fumador	1024	128	0	crónica
74 G	varón	48	fumador	1024	64	0	crónica
75 G	mujer	35	ex-fumador	0	0	0	no infección
76 G	mujer	33	no fumador	512	64	0	crónica
77 G	mujer	52	no fumador	128	64	0	crónica
78 G	varón	75	ex-fumador	128	0	0	antigua
79 G	mujer	59	no fumador	128	0	0	antigua
80 G	varón	60	fumador	64	0	0	antigua
81 G	varón	56	no fumador	0	0	0	no infección
82 G	varón	35	fumador	0	0	0	no infección
83 G	mujer	53	no fumador	128	0	0	antigua
84 G	varón	32	fumador	128	0	0	antigua
85 G	mujer	37	no fumador	64	0	0	antigua
86 G	varón	40	fumador	512	32	0	crónica
87 G	varón	40	fumador	512	256	0	aguda
88 G	mujer	24	no fumador	512	32	0	antigua
89 G	mujer	25	no fumador	32	0	0	antigua

Clave	Sexo	Edad	Tabaquismo	IgG	IgA	IgM	Infección
90 G	mujer	27	no fumador	256	0	0	antigua
91 G	mujer	40	ex-fumador	0	0	0	no infección
92 G	mujer	25	no fumador	512	0	0	aguda
93 G	mujer	40	fumador	0	0	0	no infección
94 G	mujer	40	ex-fumador	256	16	0	crónica
95 G	mujer	28	fumador	128	0	0	antigua
96 G	mujer	40	fumador	256	32	0	crónica
97 G	varón	36	fumador	512	0	0	aguda
98 G	mujer	38	fumador	0	0	0	no infección
99 G	mujer	23	no fumador	256	16	0	crónica
100 G	mujer	40	ex-fumador	256	32	0	crónica
101 G	mujer	33	no fumador	256	16	0	crónica
102 G	mujer	33	no fumador	512	0	10	aguda
103 G	mujer	50	no fumador	0	0	0	no infección
104 G	varón	19	no fumador	0	0	0	no infección
105 G	varón	74	ex-fumador	512	16	0	crónica
106 G	mujer	67	no fumador	512	16	0	crónica
107 G	varón	76	ex-fumador	1024	16	0	crónica
108 G	mujer	71	no fumador	0	0	0	no infección
109 G	varón	84	ex-fumador	1024	256	0	aguda
110 G	mujer	37	ex-fumador	128	0	0	antigua
111 G	mujer	25	no fumador	64	0	0	antigua
112 G	mujer	23	no fumador	128	0	0	antigua
113 G	mujer	40	no fumador	32	0	0	antigua
114 G	mujer	40	ex-fumador	256	0	0	antigua

IgG, IgA e IgM: se obtuvo una sola muestra de suero.

6.1. Análisis de la población asmática y diferencias entre *agudos* y *estables*.

Las características de ambos grupos de asmáticos se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Características de la población asmática

	<i>Agudos</i> n=65	<i>Estables</i> n=63	
Atopia (%)			
Intrínsecos	46 (70.7)	41 (65)	n.s
Extrínsecos	19 (29.2)	22 (34.9)	n.s
Tiempo de evolución (%)			
Larga-duración (>10 años)	37 (56.9)	26 (41.2)	n.s
Corta-duración (1-10 años)	21 (32.2)	29 (46)	n.s
Reciente (< 1año)	7 (10.7)	8 (12.6)	n.s
Gravedad			
Intermitente	7 (10.7)	11 (17.4)	p<0.05*
Persistente-Leve	11 (16.9)	20 (31.7)	
Persistente-Moderado	26 (40)	24 (38)	p<0.05**
Persistente-Grave	17 (26.1)	8 (12.6)	
Corticodpendiente	4 (6.1)	0	

*Intermitentes más leves: $\chi^2 = 6.48$ con 1 gl p = 0.01;
 χ^2 con corrección de Yates = 5.5 p = 0.018

**Graves más corticodpendientes: $\chi^2 = 6.42$ con 1 gl p = 0.01;
 χ^2 con corrección de Yates = 5.2 p = 0.02

La distribución de pacientes respecto al estado de atopia y tiempo de evolución fue similar en ambos grupos, pero la distribución de la gravedad fue diferente. En el grupo *agudos* hubo mayor proporción de pacientes con asma grave y corticodpendiente que en *estables*, (32.3% frente al 12.6%), mientras que en el grupo *estables* fue superior la

proporción de persistentes leves e intermitentes (49.2% frente al 27.6%).

Para estudiar la frecuencia de cada categoría de infección se consideró como grupo control a los *estables*. Las diferencias en la distribución de la infección y los resultados estadísticos se reflejan en la figura 8 y en la tabla 12.

En total, trece pacientes presentaban una serología compatible con infección aguda, pero en ninguno de ellos se detectó la presencia de IgM, y por lo tanto de primoinfección, por lo que fueron considerados posibles reinfecciones o reactivaciones. Cuatro pacientes del grupo *agudos* con reinfección presentaban títulos de IgA $\geq 1:256$.

El grupo *agudos* presenta mayor número de pacientes con serología compatible con infección aguda-reinfección, que los pacientes del grupo *estables* o asintomáticos (11 frente a 2). Esta diferencia es bastante significativa y el riesgo de asociación, u “odds ratio” (OR), entre la infección aguda y la crisis asmática es muy alto como vemos en la tabla 12. El riesgo atribuible sobre el total de la población es del 14% (IC 95% 4%-24%).

Figura 8. Frecuencias de infección por *C. pneumoniae*.

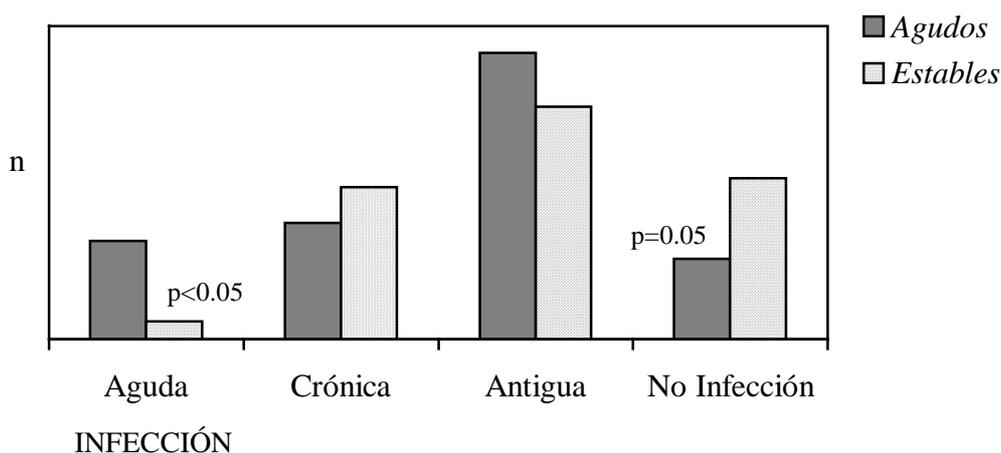


Tabla 12. Distribución de la infección por *C. pneumoniae* en asmáticos. Odds Ratio ajustada a edad, sexo y hábito de fumador.

	<i>Agudos</i> n=65	<i>Estables</i> n=63	
Infección aguda (%)	11 (16.9)	2 (3.2)	p<0.05*
OR (95% IC)	7.3 (1.5-35.7)**	1.00	
Infección crónica (%)	13 (20)	17 (27)	n.s.
OR (95% IC)	0.5 (0.2-1.3)	1.00	
Infección antigua (%)	32 (49.2)	26 (41.3)	n.s.
OR (95% IC)	1.6 (0.7-3.3)	1.00	
Total de infección (%)	56 (86.1)	45 (71.4)	p=0.05***
No infección (%)	9 (13.8)	18 (28.6)	

* $\chi^2 = 6.05$ con 1 gl p=0.013; Test exacto de Fisher p=0.016

** χ^2 de Mantel-Haenszel =6.87 con 1 gl p=0.009.

Riesgo atribuible =0.14 (IC 95% 0.04-0.24).

*** $\chi^2 = 0.13$ con 1 gl p=0.03; χ^2 con corrección de Yates =3.80 p=0.051

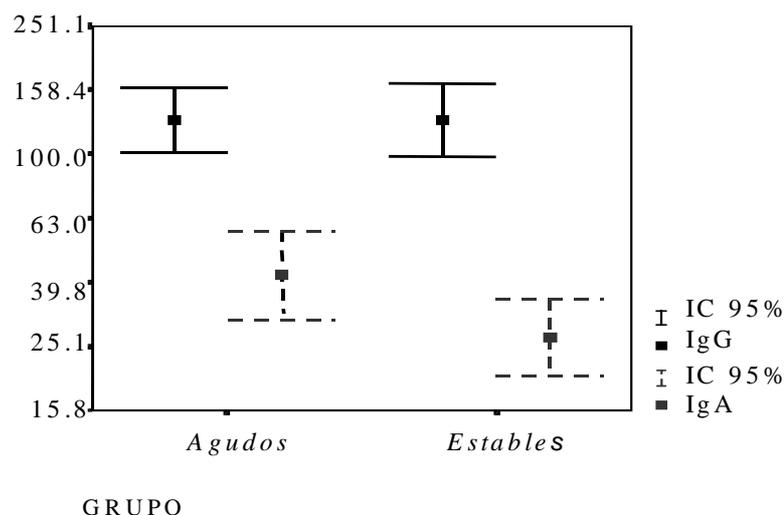
El número de pacientes con IgA $\geq 1:16$ fue el mismo en ambos grupos (17). Las medias geométricas de los títulos (MGT) fueron, 58.8 (IC 95% 37.1-91.2) para *agudos* y 34.6 (IC 95% 23.9-48.9) para *estables* (figura 9). Esta diferencia de medias fue escasamente significativa (t-Test =1.95 p=0.059; U Mann Whitney p=0.054).

Sin embargo tras estratificar los títulos de IgA, se observó una relación entre tener títulos de IgA $\geq 1:64$ y pertenecer a *agudos* ($\chi^2 = 4.58$ p=0.03; OR ajustada 12.5 IC 95% 1.2-126.2). El intervalo de confianza resulta demasiado amplio debido al pequeño tamaño de la muestra y a la falta de linealidad de la variable IgA al ser una variable de intervalo y de carácter geométrico.

Los títulos de IgG fueron similares en ambos grupos (figura 9). El grupo *agudos* tuvo

una MGT de 123 (IC 95% 87-173.7) y estables de 125 (IC 95% 95.4-169.8). No hubo diferencia de medias (t-Test =0.106 p=0.916; U de Mann Whitney =0.66).

Figura 9. Medias Geométricas de los Títulos de IgG e IgA de *C. pneumoniae* en asmáticos (recíproco del logaritmo del título).



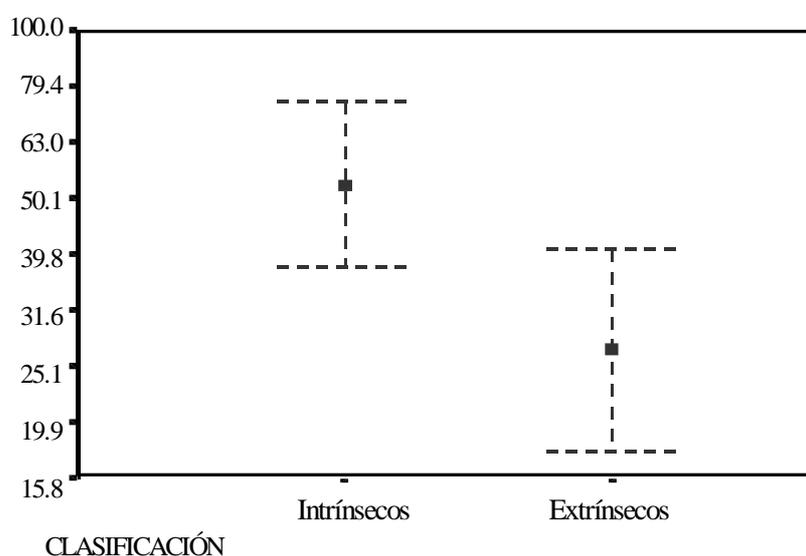
No se estudiaron diferencia clínicas o funcionales entre los pacientes con posible reinfección por ser un número escaso para encontrar diferencias si las hubiera. Sin embargo 9 pacientes eran de larga-duración, y 4 recientes, con la ausencia de los de corta-duración.

Para estudiar si existía alguna relación entre los títulos de IgG ($\geq 1:128$) y el grado de gravedad se agrupó a todos los pacientes en: A) *pacientes con mayor grado de gravedad*, que incluía a los pacientes corticodependientes, persistentes graves y persistentes moderados (n=79) y B) *pacientes con menor grado de gravedad*, que incluía a los pacientes persistentes leves y los intermitentes (n=49). El grupo A evidenció un 78.4% (62) de infección y el grupo B un 81.6% (40) ($\chi^2=0.07$ p=0.77). No se halló relación con la presencia de títulos altos de IgG ($\chi^2=33.2$ p=0.4; OR 2.0 IC 95% 0.8-4.7). Respecto a la

detección de IgA, en el grupo A el 27,8 % (22 pacientes) eran IgA positiva y en el grupo B el 24.4 % (12 pacientes). La diferencia no fue significativa ($\chi^2=0.6$ p=0.68).

En relación con el estado de atopia se detectó infección en el 77% (67) de los pacientes intrínsecos y en el 82,9 % (34) de los extrínsecos ($\chi^2=0.58$ p=0.44). La MGT de IgG para intrínsecos fue 125.8 (IC 95% 100-158.4) y 79.4 (IC 95% 63-125.8) en extrínsecos (t-Test =1.53 p=0.128; U Mann Whitney p=0.122). Así mismo el 29.8% (26) de los pacientes intrínsecos y el 19.5% (8) de los extrínsecos tenían IgA positiva ($\chi^2=1.65$ p=0.19). La MGT de IgA fue 50.1 (IC 95% 31.6-63) para intrínsecos y 25.1 (IC 95% 15.8-39.8) para extrínsecos (figura 10). Esta diferencia de medias fue significativa (t-Test =2.1 p=0.039; U Mann Whitney p=0.028).

Figura 10. Medias geométricas de los títulos de IgA según el estado de atopia. (recíproco del logaritmo del título). Intervalo de confianza del 95%.



También se estudió en el conjunto de la población, la relación entre el tiempo de evolución, la seroprevalencia y la presencia de títulos altos de IgG ($\geq 1:128$). Del total de pacientes asmáticos de larga-duración con infección, el 62.2% (33) pertenecían al grupo *agudos* y el 37.7% (20) a *estables*. Las diferencias en el porcentaje de infección no fueron significativas ($\chi^2 = 3.2$ $p=0.19$). En el estudio de las MGTs de IgG en cada categoría, se observaron diferencias significativas a favor de títulos más altos en los pacientes recientes y de larga-duración (figura 11). El número de pacientes recientes era pequeño (15), pero casi todos tenían IgG positiva y la mitad presentaba un título $\geq 1:512$. Las diferencias entre categorías se reflejan en las tabla 13.

Tabla 13. Seroprevalencia y títulos de IgG de *C. pneumoniae*, respecto al tiempo de evolución del asma.

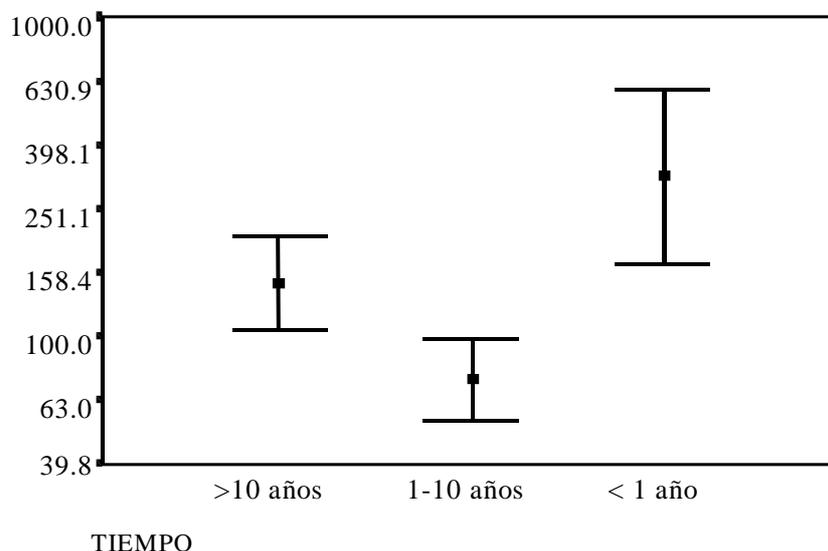
	<i>Larga-duración</i> n=63	<i>Corta-duración</i> n=50	<i>Recientes</i> n=15	
IgG ≥ 1.16 (%)	53 (84.1)	36 (72)	13 (86.6)	n.s.
Moda	128	64	512	
Mediana	128	64	512	
MGT IgG	125.8 (100-199.5)	63(50.1-79.4)	316 (158.4-501)	$p<0.01^*$

*Anova (F)= 9.8 $p=0.0001$; Test de Kruskal-Wallis $p=0.0005$.

Test de Tukey. Comparación de medias dos a dos. Nivel de significación al 5%.

Larga-duración	Corta-duración	$p=0.01$
Larga-duración	Recientes	$p=0.05$
Corta-duración	Recientes	$p=0.000$

Figura 11. Medias geométricas de los títulos de IgG de *C. pneumoniae* según el tiempo de evolución del asma (recíproco del logaritmo del título). Intervalo de confianza al 95%.



En la comparación de medias dos a dos, la diferencia más notable fue entre los pacientes recientes y los de corta duración pero también existe una diferencia notable en el número de observaciones en cada categoría. También observamos que la MGT de la categoría larga-duración era significativamente mayor que la MGT de corta-duración (t-Test =2.9 p=0.04; U Mann Whitney p=0.01) pero no se pudo relacionar la categoría larga-duración con el predominio de títulos altos de IgG ($\chi^2 = 3.07$ p= 0.07). Se agruparon las categorías corta-duración y recientes, para aumentar el número de casos pero tampoco hubo diferencias respecto a larga-duración ($\chi^2 =0.51$ p=0.47).

Con respecto a *C. trachomatis* y *C. psittaci*, ningún paciente asmático tuvo IgG o IgM positivas.

6.2. Comparación de las tres poblaciones. Diferencias entre asmáticos y población general.

En la figura 12 se aprecia la distribución de cada categoría de infección en cada población. No hubo diferencias en la frecuencia de infección ($\text{IgG} \geq 1:16$) entre los tres grupos ($\chi^2 = 3.66$ $p=0.16$). En el análisis de la distribución de cada categoría de infección se consideró como grupo control a *general* (tabla 15). En *estables* el número de posibles infecciones agudas fue menor con respecto a *general* pero no alcanzó significación estadística.

En el grupo *general* se detectaron tres sujetos con IgG positiva a *C. trachomatis* y dos con IgG positiva a *C. psittaci*. Todos tenían además serología positiva a *C. pneumoniae*. En los cinco casos el título de IgG para *C. pneumoniae* superaba en más de dos diluciones los títulos de IgG para *C. trachomatis* y *C. psittaci*.

Figura 12. Distribución apilada de los porcentajes de infección por *C. pneumoniae*

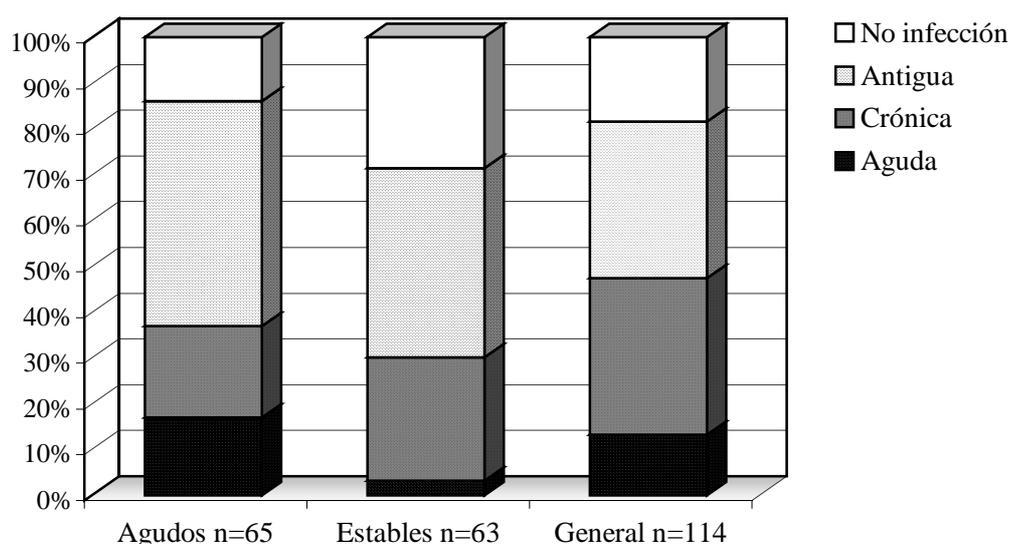


Tabla 14. Distribución de la infección por *C. pneumoniae* en cada grupo. Odds Ratio ajustada por edad, sexo y hábito de fumador.

	Agudos n=65	Estables n=63	General n=114 (controles)	
Infección aguda (%)	11 (16.9)	2 (3.2)*	15 (13.2)*	n.s.
OR (IC 95%)	2.2 (0.6-0.9)	0.1 (0.03-0.9)	1.0	
Infección crónica (%)	13 (20)	17 (27)	39 (34.2)	n.s.
OR (IC 95%)	0.9 (0.3-2.8)	0.5 (0.2-1.4)	1.0	
Infección antigua (%)	32 (49.2)	26 (41.3)	39 (34.2)	n.s.
OR (IC 95%)	2.3 (0.8-6.0)	0.7 (0.3-1.8)	1.0	
No infección (%)	9 (13.8)	18 (28.6)	21 (18.4)	

* $\chi^2 = 4.19$ con 1 gl, $p=0.04$; χ^2 con corrección de Yates = 3.4 $p=0.06$.

La MGT de IgG fue superior en el grupo control, *general* (figura 11), aunque la diferencia no fue significativa (Anova F = 2.20 $p=0.134$; Kruskal Wallis $p=0.114$). Estratificamos los títulos positivos en IgG < 1:128, $\geq 1:128$ y $\geq 1:512$ para determinar la presencia de títulos altos en alguno de los grupos, pero tampoco hubo diferencias ($\chi^2 = 5.3$ $p=0.24$). Aunque existe una tendencia a presentar títulos mayores de IgA en los pacientes del grupo *agudos* (figura 13), tampoco hubo significación en la diferencia de medias (Anova F=1.88 $p=0.160$; Kruskal Wallis $p=0.179$).

Se detectaron 5 sujetos con IgM positiva en *general* que fueron considerados primoinfección y 10 casos de posible reinfección. En un caso, la IgM fue positiva para las tres especies de *Chlamydia*, pero además presentaba IgG positiva a *C. pneumoniae*. En otro caso se detectó IgM positiva a *C. trachomatis*, también con IgG positiva para *C. pneumoniae*.

Las seroprevalencias y títulos de IgG e IgA se recogen en la tabla 15.

Figura 13. Medias geométricas de IgG e IgA de *C. pneumoniae* en cada grupo (recíproco del logaritmo del título).

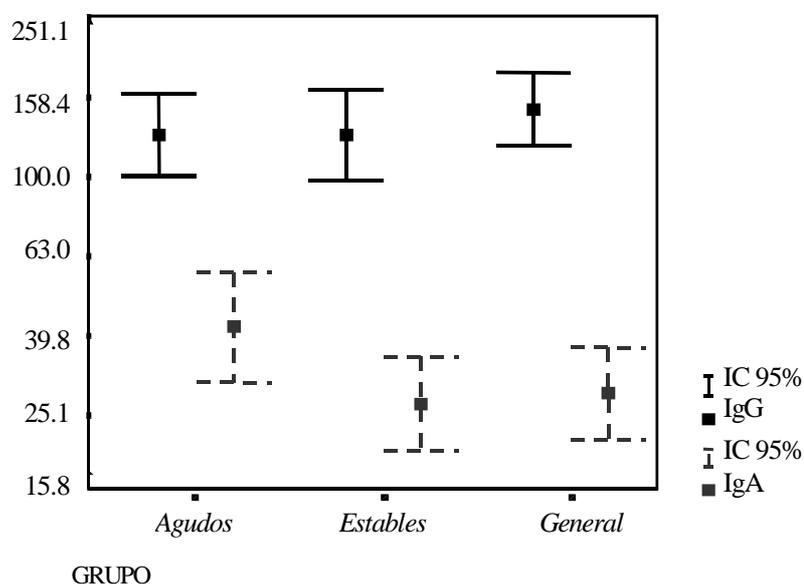


Tabla 15. Seroprevalencia de *C. pneumoniae* y títulos de las tres poblaciones.

	Agudos n=65	Estables n=63	General n=114	
IgG \geq 1:16 (%)	56 (86.1)	45 (71.4)	93 (81)	n.s.
Límites	0-4096	0-1026	0-2048	
IQR	93	16	224	
Mediana	128	64	128	
Moda	128	128	128	
MGT (IC 95%)	123 (87-173.7)	125 (95.4-169.8)	173.7 (138-218.7)	n.s.
IgA \geq 1:16	17 (26.1)	17 (26.9)	42 (36.8)	n.s.
Límites	0-512	0-128	0-256	
IQR	16	16	16	
Mediana	0	0	32	
Moda	0	0	0	
MGT (IC 95%)	58.8 (37.1-91.2)	34.6 (23.9-48.9)	39.8 (30.1-52.4)	n.s.
IgM positivas	0	0	5	

IQR: Amplitud intercuartílica (Q75-Q25); MGT: Media geométrica de los títulos.

7. DISCUSIÓN.

Tres características son necesarias para establecer que un microorganismo tiene un papel promotor de la enfermedad asmática: i) la demostración de su persistencia en el sitio de la inflamación; ii) la presencia de mecanismos inmunológicos que promuevan la inflamación y los síntomas asmáticos; iii) la eliminación del agente con terapia inmunización u otras vías seguida de la mejoría sintomática y funcional.

Como hemos expuesto en el apartado 3.5., *Inmunología y Patogénesis*, *C. pneumoniae* posee mecanismos inmunopatológicos que podrían inducir la producción de asma. Hipotéticamente, *C. pneumoniae* podría actuar como algunos virus y producir inflamación asmática por desviación de la respuesta inmune hacia una respuesta “alérgica” o Th2.

En una revisión realizada por Hahn¹⁶⁰, se hallaron 18 estudios epidemiológicos controlados con un total de 4000 casos estudiados. En 15 estudios se encontró algún tipo de asociación significativa entre la infección por *C. pneumoniae* y asma, a través de la identificación directa del organismo, la detección de anticuerpos específicos (IgA, IgG e IgE) o la detección de inmunocomplejos circulantes. También añade 13 series de casos y 8 notificaciones (100 casos) de pacientes asmáticos con infección por *C. pneumoniae* y descripciones de la mejoría o completa desaparición de los síntomas asmáticos tras el tratamiento prolongado con antibióticos específicos. Así mismos incluye 6 estudios controlados realizados en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), con un total de 1000 pacientes, en los que se encontró asociación significativa en cinco. Comentaromos los artículos más destacados.

Posteriormente han sido publicados más estudios controlados, a favor y en contra de la asociación según criterios epidemiológicos y clasificación de la enfermedad asmática^{251,252,253,254,255} que también serán comentados.

7.1. DISCUSIÓN DE LA BIBLIOGRAFIA.

7.1.1. Primeras evidencias que relacionan la infección por *C. pneumoniae* y asma.

Las primeras comunicaciones mostrando evidencia a favor una posible relación entre la infección por *C. pneumoniae* y el asma hacen referencia al desarrollo de la enfermedad tras sufrir una infección aguda reciente por *C. pneumoniae*:

En 1989, Fryden y cols²⁵⁶., comunicaron el primer caso del inicio de una bronquitis asmática crónica grave como consecuencia de una infección aguda por *Chlamydia pneumoniae* (TWAR).

Hahn y Golubjatnikov²⁵⁷ en 1994 publicaron una serie de casos con 131 pacientes afectados de enfermedad respiratoria con y sin sibilancias. Doce pacientes presentaban asma crónica, 5 de diagnóstico reciente, 30 se consideraron bronquitis asmática aguda sin antecedentes de asma y 89 enfermedad respiratoria sin disnea sibilante. El 100% de los pacientes asmáticos presentaban serología positiva a *C. pneumoniae*, el 80% de los pacientes con bronquitis asmática y el 52.8% de los pacientes con enfermedad respiratoria sin sibilancias. En 2 de los 5 pacientes con asma reciente se detectaron evidencias de infección aguda por *C. pneumoniae*. Los autores sugieren por primera vez la posible relación de la infección aguda por *C. pneumoniae* y el inicio posterior de la enfermedad asmática.

Más tarde Hahn y McDonald⁶⁹ comunicaron una serie de 10 pacientes que presentaron su primer episodio de broncoespasmo y sibilancias al mismo tiempo que seroconversión. Cinco de ellos desarrollaron posteriormente un asma crónica.

Otros autores también han referido casos de pacientes adultos y niños que tras una infección aguda por *C. pneumoniae* desarrollaron síntomas asmáticos y broncoespasmos^{137,258,259}.

No sólo se han establecido estas relaciones mediante la serología con MIF. Se ha comunicado el aislamiento en cultivo de *C. pneumoniae* en muestras de niños y adultos que a su vez eran diagnosticados por primera vez de asma^{58,70}. También se ha comunicado la aparición persistente de hiperreactividad de la vía aérea en adultos, tras una infección aguda por *C. pneumoniae* confirmada por PCR y cultivo^{55,258} y el desarrollo de bronquitis asmática tras presentar cultivos positivos persistentes¹³⁷. En otro caso, se documentó la aparición del primer ataque de asma en un trabajador de laboratorio infectado accidentalmente por *C. pneumoniae* y tras sufrir una neumonía¹³².

El primer estudio amplio que mostró evidencias de asociación entre la infección por *C. pneumoniae* y la presencia de síntomas relacionados con el asma se publicó en 1991. Hahn y cols¹⁵⁸ estudiaron y siguieron durante 6 meses los síntomas de 365 pacientes adultos con enfermedad respiratoria aguda, diagnosticando serológicamente de infección aguda por *C. pneumoniae* a 19 (5%), de los cuales 9 (47%) presentaron broncoespasmo y sibilancias. Cuatro de estos pacientes habían sido diagnosticados previamente de asma y presentaban una reagudización y otros 4 fueron diagnosticados por primera vez de asma en los meses siguientes. En el estudio pareado se comprobó que existía un riesgo asociado de desarrollar bronquitis asmática tras sufrir una infección respiratoria por *C. pneumoniae* (OR 7.2 IC 95% 2.2-23.4). Además se observó una relación entre los títulos de anticuerpos (polivalentes) $\geq 1:128$ y la presencia de sibilancias (OR 3.5 IC 95% 1.2-9.7). El 80% de los

pacientes diagnosticados de asma tras la infección respiratoria presentaba títulos $\geq 1:64$. La edad de los pacientes con bronquitis asmática y títulos $\geq 1:64$ fue significativamente mayor con respecto a los seronegativos. La asociación significativa respecto a los títulos de anticuerpos se vió reforzada cuando se eliminaron del análisis de regresión los sujetos con historia de atopia. Los autores sugirieron entonces que los títulos altos pueden indicar reinfecciones o infecciones persistentes y plantean que las exposiciones repetidas al microorganismo pueden tener asociación causal con los síntomas asmáticos y la propia enfermedad asmática.

Los criterios empleados en los estudios casos-control para definir el diagnóstico de asma han sido variables. En las primeras observaciones de asociación con la presencia de sibilancias, bronquitis asmática y asma de inicio en adultos, no se emplearon criterios de medida de la función pulmonar para definir asma¹⁵⁸, pero posteriormente sí se aplicaron en estudios de seguimiento²⁵⁷.

Otros autores también han relacionado la infección aguda por *C. pneumoniae* con el desencadenamiento de los síntomas asmáticos como veremos a continuación.

7.1.2. Infección aguda por *C. pneumoniae* y crisis asmática.

Allegra y cols⁴⁸. en una serie de 74 pacientes asmáticos con crisis detectaron seroconversión a *Chlamydia pneumoniae* en 7 (9%), infección viral en 8 (11%) y a *M pneumoniae* en 1 (1%). En dos de los 7 pacientes con seroconversión a *C. pneumoniae* se identificó a la bacteria en muestras de faringe mediante inmunofluorescencia indirecta.

Thom y cols⁵⁵. comunicaron que el 19% de 21 pacientes adultos mayores y de mediana edad e infección respiratoria aguda por *C. pneumoniae* presentaron sibilancias y

broncoespasmo, siendo similar la proporción de pacientes con infección por *M. pneumoniae* y virus Influenza.

Peters y cols⁵⁴. estudiaron 46 pacientes asmáticos con exacerbación y dos grupos controles, grupo A con 53 pacientes no asmáticos con enfermedad respiratoria aguda y grupo B con 23 sujetos no asmáticos y asintomáticos. Los autores encontraron un 22% de asmáticos reagudizados con evidencias serológicas de infección aguda por *C. pneumoniae* frente a un 8% y un 4% en los grupos control A y B. Las diferencias fueron fuertemente significativas.

Björnsson y cols²⁶⁰. compararon los sueros de 122 pacientes con síntomas asmáticos que participaron en un estudio de alergias, con los sueros de 75 personas de la población general asintomática y encontraron relación entre la infección aguda por *C. pneumoniae* (IgM \geq 1:16 y/o IgG \geq 1:512) e historia de sibilancias (OR=6.7 IC 95%:1.3-35.7) y entre IgA \geq 1:32 y pruebas de hiperreactividad bronquial positivas.

En una serie de 78 niños admitidos en urgencias por cuadros de sibilancias y bronquiolitis se detectó *C. pneumoniae* por PCR en secreciones respiratorias en el 37% de los niños. El 18 % de las detecciones positivas fueron en niños menores de 3 meses de edad y el 58 % en mayores de esa edad²⁶¹.

Kamekasi y cols⁵⁹. en una serie de 33 niños con exacerbación asmática, 15 fueron diagnosticados de infección por *C. pneumoniae*, 12 (39%) con evidencias serológicas de infección aguda y 8 de ellos con cultivo positivo. Otros 3 presentaron sólo cultivo positivo. Los autores sugieren que la alta incidencia de infección puede estar asociada con la presencia de los síntomas.

De lo anteriormente comentado parece que *C. pneumoniae* es capaz de provocar crisis asmática en un porcentaje variable, pero destacado, de adultos y niños con asma Pero también existen autores que no hallan una relación significativa entre la infección aguda

por *C. pneumoniae* y los síntomas asmáticos, con respecto a otros agentes o con respecto al resto de la población:

Grayston¹⁴⁴ no encontró diferencias significativas en la incidencia de sibilancias y asma ante una infección por *C. pneumoniae* respecto a *M. pneumoniae* y enfermedades virales.

Teichtal y cols²⁶². estudiaron por medio de cultivo e inmunología la incidencia de infección respiratoria aguda en 79 pacientes hospitalizados por asma frente a 54 controles. El 37% de los enfermos con asma tuvieron evidencias de infección respiratoria, la mayoría por virus, frente al 9% de grupos control. Se detectaron tres casos de infección bacteriana, *M. pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* y ninguno por *C. pneumoniae*.

Cook y cols²⁷⁶. determinaron la presencia de infección aguda e infección previa en 123 pacientes con asma agudizada, 46 pacientes con asma grave crónica o *brittle asthma* y 1518 controles escogidos entre pacientes ingresados por enfermedades no pulmonares ni cardiovasculares. En los resultados no se encontraron asociaciones significativas entre el grupo de asmáticos agudizados y el grupo control con respecto a la presencia de infección aguda e infección previa pero sí se encontró asociación entre la infección previa ($IgG \geq 1:64 \leq 1:256$) y el asma grave crónica (35% casos, 13% controles, OR=3.9 IC 95% 1.60-9.97). Hay que tener en cuenta que el grupo control se componía de pacientes no asmáticos hospitalarios que pudieran tener un riesgo aumentado de padecer infección por *C. pneumoniae*.

Emre y cols²⁶³. estudiaron la producción de IgE específica por “immunoblotting” en 45 niños con asma agudizado con y sin infección por *C. pneumoniae*, junto con la elevación de IgG e IgM. No se observaron diferencias en la elevación de los títulos de IgG, IgM e IgE frente a los niños sin infección. Sin embargo, se detectó IgE específica en 12 de

14 niños asmáticos con sibilancias y cultivo positivo (86%), 2 de 11 con cultivo negativo, en 1 de 11 pacientes con neumonía, no asmáticos y cultivo positivo y en 2 de 9 pacientes asintomáticos con cultivo negativo. La diferencia entre los asmáticos con cultivo positivo y los otros grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Los autores sugieren que puede tratarse de un mecanismo de reactivación de la enfermedad en niños con infección.

Como vemos, aunque existen discrepancias, son más frecuentes las evidencias a favor de una relación significativa entre *C. pneumoniae* y la aparición de síntomas asmáticos.

7.1.3. Infección persistente e inicio de la enfermedad asmática en el adulto.

Otra de las relaciones sugeridas es la existencia de una infección crónica o persistente que de lugar al desarrollo de la enfermedad asmática. La presencia mantenida de IgA se considera marcador de infección crónica o persistente puesto que es un anticuerpo de vida media corta. En los enfermos de fibrosis quística, son habituales las infecciones respiratorias por *Pseudomonas aeruginosa*²⁶⁴. Se ha visto en estos pacientes que la presencia en suero de IgA específica contra la bacteria se correlaciona con la reaparición de la bacteria en el tracto respiratorio a pesar de su aparente erradicación con tratamiento antibiótico. Algo parecido se ha observado en la infección aguda por *Yersinia enterocolítica*, en la que la detección de IgA se asocia con el desarrollo posterior de artritis reactiva²⁶⁵.

La presencia mantenida de IgA así como la presencia de inmunocomplejos formados con IgG o IgM y antígenos LPS o proteínas clamidiales, se ha asociado con la enfermedad coronaria^{174,175}.

Así mismo, se ha demostrado la presencia de IgA específica para *C. pneumoniae* en el esputo de pacientes con bronquitis crónica²⁶⁶, en pacientes con faringitis crónica con

aislamiento de *C. pneumoniae* en cultivo o PCR positiva²⁶⁷ y en pacientes con sinusitis crónica y PCR positiva²⁶⁸. También las infecciones crónicas por *C. trachomatis* se han asociado con la presencia de IgA²⁶⁹.

El asma ha sido asociado con anticuerpos IgA en suero y/o en secreciones, pero no con inmunocomplejos^{275,272}. En niños se ha observado mayor seroprevalencia de IgA en aquellos que sufrían exacerbaciones con más frecuencia. Cunningham y cols²⁷⁰. tomaron muestras de aspirado nasal para PCR y muestras para serología de IgA a 108 niños con asma durante 13 meses repitiendo las tomas a 65 niños asintomáticos. El 51% del total de niños presentó PCR positiva para *C. pneumoniae*. Se detectó *M. pneumoniae* en sólo dos casos. No hubo diferencias en la detección por PCR entre el periodo de exacerbación y el asintomático, pero en los niños que sufrieron más de 4 episodios de asma durante el periodo de seguimiento la presencia de IgA fue siete veces mayor ($p < 0.002$). Esto podría indicar la frecuencia de la infección en niños y la colaboración de la respuesta inmunológica en el desencadenamiento de las crisis.

También en pacientes previamente asintomáticos, que tras sufrir una infección aguda por *C. pneumoniae*, desarrollaron enfermedad asmática, se detectó IgA específica en suero de forma persistente⁶⁹.

Por otro lado parece frecuente la asociación de los anticuerpos IgA anti-*C. pneumoniae* con formas de asma bronquial no atópica o “asma infecciosa”²⁷¹:

Estudios de casos y controles han mostrado que la presencia de IgA específica puede estar asociada con la aparición reciente de síntomas asmáticos y con la entidad conocida como “asma infecciosa”. En una serie de 104 pacientes asmáticos clasificados en un grupo de “asma no infecciosa” (atópicos, ocupacional y por ejercicio) y otro de “asma infecciosa” (de inicio posterior a una infección respiratoria aguda, no atópica), se observó que el 62% de los pacientes con “asma infecciosa” o no atópicos presentaba títulos de IgG $\geq 1:128$ e

IgA \geq 1:16, frente al 22% de los pacientes atópicos ($p < 0.001$) y con un valor predictivo positivo de pertenecer al grupo de “asma infecciosa” del 87%³⁵.

Hahn y cols²⁷². determinaron la presencia de IgG, IgA, la fracción IgG₄ y de inmunocomplejos específicos a *C. pneumoniae* en un estudio caso-control con 25 adultos que presentaron síntomas asmáticos por primera vez durante dos años de estudio y 45 controles no asmáticos asintomáticos. Sólo hallaron diferencias significativas en la prevalencia de IgA en los enfermos asmáticos (72% vs 44%) con un riesgo asociado y ajustado por edad, sexo y hábito de fumador de 3.7 (IC 95% 1.2-11.5). Los autores asocian la presencia de IgA con los síntomas obstructivos reversibles y recientes de los enfermos adultos con asma.

Hahn y cols²⁵⁵. estudiaron los sueros de 164 pacientes adultos para determinar si existía relación de los marcadores serológicos con el asma no atópica o asociada a infección. Incluyeron 68 pacientes asmáticos no atópicos, 36 atópicos, 16 pacientes no asmáticos con bronquitis y 44 controles sanos asintomáticos, en los que determinaron las concentraciones de IgG, IgA, CHSP60 e IgE. La seroprevalencia de IgG e IgA fue significativamente mayor en los grupos de asma asociado a infección y controles con bronquitis (94% y 93% para IgG, 75% y 69% para IgA) frente a los atópicos y asintomáticos (61% y 84% para IgG, 31% y 43% para IgA, $p < 0.02$ ajustado). También fueron superiores en los asmáticos no atópicos y controles con bronquitis la media geométrica de los títulos (MGT) de IgG e IgA ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$). En la comparación dos a dos, la seroprevalencia de IgG fue significativamente diferente entre no atópicos y atópicos a favor de los primeros (94% vs 61%, $p < 0.001$) así como la MGT (86.9 vs 30.2, $p = 0.0001$), pero no hubo diferencias con los controles asintomáticos. También hubo diferencias significativas en la seroprevalencia de IgA (75% vs 31%, $p < 0.001$) y su MGT (21.5 vs 7.7, $p < 0.001$) con respecto a los atópicos y frente a la seroprevalencia de IgA en

controles asintomáticos (75% vs 43%, $p=0.01$) y su MGT (21.5 vs 9.5, $p<0.001$). Por otro lado, también se encontró mayor porcentaje de pacientes no atópicos con anticuerpos CHSP60 respecto a los atópicos (19% vs 3% $p=0.02$). Se detectó IgE específica en 5 pacientes con anticuerpos CHSP60 positivos. Los autores establecen que existe una relación entre los marcadores serológicos, el asma no atópica o asociada a infección y la bronquitis aguda, y sugieren su utilidad en la clasificación y diagnóstico del asma.

La capacidad de *C. pneumoniae* para producir infección persistente e inflamación pulmonar ha sido observada en modelos animales²⁷³, y en humanos incluidos pacientes de asma⁷⁰. En este último caso dos pacientes adultos fueron diagnosticados de asma de reciente comienzo mientras presentaban cultivos positivos persistentes de *C. pneumoniae*. Previamente habían presentado episodios de bronquitis asmática aguda y se les había detectado títulos de anticuerpos compatibles con infección crónica sin evidencias de infección aguda, lo que sugiere la existencia de infección persistente previa al desarrollo del asma crónica. Hay que tener en cuenta que la persistencia no implica forzosamente una asociación continua causal, y la bacteria podría actuar sólo como un iniciador. También es necesario distinguir el papel de patógeno o co-patógeno con el de colonizador²⁷⁴. La detección en lugares que albergan flora colonizante, como la faringe, no supone la presencia de una infección. La frecuencia de identificación de *C. pneumoniae* en cultivos de muestras de nasofaringe de adultos asmáticos suele ser baja⁷⁰, pero en niños asmáticos se ha conseguido identificar hasta en un 10% en cultivo y un 47% por PCR²⁷⁵. La detección molecular de la bacteria por PCR es significativamente más prevalente en la población infantil e induce a pensar una respuesta inmunitaria retardada que contribuye a establecer perfiles serológicos relacionados con la edad^{270,261}. Quizás sean necesarias muestras directas del tracto respiratorio inferior para demostrar la persistencia de la bacteria en los adultos con un diagnóstico reciente de asma.

Otros autores también han comunicado una relación entre la infección por *C. pneumoniae*, el asma no atópico y el tiempo de evolución de la enfermedad:

Von Hertzen y cols²⁵¹. investigaron la asociación serológica de la infección por *C. pneumoniae* y los títulos elevados de IgG e IgA con el asma en adultos y el estado de atopía. Se estudiaron 430 sujetos (122 hombres y 308 mujeres, con una edad media por debajo de los 40 años). Se distribuyó a los asmáticos en asmáticos recientes (<7 años del diagnóstico n=224) y de larga duración (n=108) y se seleccionó a 98 controles no asmáticos. En ambos grupos de asmáticos se incluyeron pacientes atópicos y no atópicos. En el análisis de regresión logística se encontró que existía relación entre los títulos altos de IgG y el asma de larga duración (OR=3.3 IC 95% 1.6-6.8), reciente (OR=2.3 IC 95% 1.2-4.4) y no atópicos (OR=3.3 IC 95% 1.4-7.7), especialmente de larga duración (OR=6.0 IC 95% 2.1-17.1). En el análisis por separado de sexos en casos y controles, la prevalencia de IgG \geq 1:128 e IgA \geq 1:32, así como las MGT fueron significativamente mayores en las mujeres asmáticas no atópicas de larga duración (seroprevalencia $p < 0.01$ MGT $p < 0.05$). En hombres no se hallaron diferencias. La falta de relación de los títulos elevados de IgG con ser atópico, indica según los autores, que el asma no predispone a la infección por *C. pneumoniae*. Los autores resaltan la asociación de los títulos serológicos elevados con el asma no atópico de larga duración.

Por lo tanto, las evidencias que apoyan el papel de la infección con el inicio de la infección en adultos apuntan más a la asociación con el isotipo IgA, especialmente como un marcador de infección crónica^{35,272}. La detección de IgA puede ser específica aunque no es sensible al 100%, y no se ha demostrado la correlación directa de la presencia de IgA con la detección del organismo por PCR o cultivo.

7.1.4. Infección por *C. pneumoniae* y aumento de la gravedad del asma.

También se ha relacionado la infección por *C. pneumoniae* con la gravedad de la enfermedad asmática:

En el estudio de Cook y cols²⁷⁶. se observó la posible asociación entre títulos de infección antigua y el asma grave crónica (OR=3.9 IC 95% 1.60-9.97).

Posteriormente Black y cols²⁵³. encuentran relación entre los altos títulos de anticuerpos a *C. pneumoniae* y los marcadores de gravedad del asma. En su estudio con 619 pacientes asmáticos entre 18-60 años, se asoció el uso de altas dosis de esteroides inhalados con un aumento del 74.1% en el título de IgG (p=0.04) y del 70.6% para IgA (p=0.0001), comparado con el uso de bajas dosis de esteroides. En la combinación de IgG $\geq 1:64$ e IgA $\geq 1:16$ frente a IgG $\leq 1:64$ el riesgo asociado u OR fue 4.4 (IC 95% 2.3-8.5, p=0.0001) para los pacientes con altas dosis de esteroides inhalados. Así mismo existía una relación inversa entre los títulos serológicos y el porcentaje del FEV₁ previsto en los pacientes con títulos elevados de IgG y/o IgA (p=0.04). La seroprevalencia de IgA se asoció con mayor puntuación en la frecuencia de síntomas diarios (p=0.04). Se hallaron también relaciones significativas entre los títulos elevados de anticuerpos y los pacientes que no tomaban esteroides inhalados. Esto hace posible que los hallazgos anteriores no se deban simplemente a la reactivación de la infección por el uso de corticosteroides inhalados. Los autores plantean la posibilidad de que la infección crónica por *C. pneumoniae* condicione un aumento en la gravedad del asma.

7.1.5. Mejoría de los síntomas asmáticos tras el tratamiento antibiótico específico.

Existen distintos trabajos publicados que han probado el uso de antibióticos específicos en pacientes con síntomas asmáticos:

El más completo es el estudio de Hahn⁷⁰, en el cual se administró durante cuatro semanas a 46 enfermos adultos con asma y serología positiva para *C. pneumoniae*, tratamiento específico anticlamidia con doxiciclina, azitromicina o eritromicina y con un seguimiento posterior de los pacientes de seis meses. La función respiratoria mejoró en el 60% de los enfermos, con remisión en el 50%. Los mejores resultados se obtuvieron en el asma leve y de corta evolución y con tratamientos superiores a tres semanas. Previamente se había comunicado la desaparición de los síntomas asmáticos, e incluso en un caso de la eosinofilia, presentes en pacientes con cultivos positivos y títulos altos tras ser tratados con antibioterapia específica prolongada^{277, 278}.

Hahn y cols²⁷⁹ publicaron en 1998 los resultados de la administración de antibióticos macrólidos durante 6-16 meses a tres pacientes no fumadores, de 13, 45 y 65 años de edad, con asma grave corticodependiente, que presentaban títulos de IgG =1:512. Los tres pacientes experimentaron una respuesta favorable y estable pudiendo discontinuar el tratamiento esteroideo oral.

Emre y cols⁵⁸ en un estudio controlado con 118 niños asmáticos, entre 5-16 años con episodios de sibilancias, y 41 niños no asmáticos, aislaron *C. pneumoniae* en 13 niños con sibilancias, de los que 3 seroconvirtieron. En el 58% de los niños con aislamiento positivo no se detectaron anticuerpos específicos. No hubo diferencias serológicas significativas ni de cultivo positivo entre ambos grupos pero tras administrar a los niños con sibilancias y cultivo positivo claritromicina o eritromicina durante 10-15 días se consiguió la erradicación del microorganismo en 12 y mejoría clínica y funcional en 9 (75%).

Otro estudio sueco refiere que un niño con asma persistente moderada, PCR positiva y seroconversión experimento mejoría de los síntomas y negativización de la detección tras el tratamiento con azitromicina²⁸⁰.

Se está llevado a cabo el estudio CARM (*Chlamydia pneumoniae Asthma Roxithromycin Multinacional*) prospectivo a doble ciego, multicéntrico en cuatro países (Australia, Argentina, Italia y Nueva Zelanda) aleatorizado y controlado con placebo administrando 150 gramos/12 horas de roxitromicina en adultos asmáticos estables con anticuerpos positivos a *Chlamydia pneumoniae* y realizando un seguimiento posterior durante 6 meses. Los primeros resultados comunicados²⁸¹ indican que el 82% de los pacientes tienen títulos de IgG $\geq 1:16$, asociado al uso de dosis altas de corticosteroides, sexo masculino y reducción del FEV₁ respecto al 50% del grupo control. El 53% de los asmáticos seropositivos presentan títulos altos de IgG ($\geq 1:64$) y el 20% de IgA ($\geq 1:32$). Un 18% de pacientes es seronegativo. Aún no tenemos datos de eficacia terapéutica.

A pesar de los resultados favorables, los ensayos terapéuticos realizados con macrólidos que evidencian la mejoría de los síntomas asmáticos, no eliminan la influencia de los factores antiinflamatorios, acción sobre los corticosteroides e interacción con el resto de los fármacos usados en estos pacientes^{58,70,279,280}. Además del grupo placebo deben estudiarse pacientes asmáticos estables, independientemente de su seropositividad a *C. pneumoniae*.

7.1.6. Diferencias de seroprevalencias entre asmáticos y no asmáticos.

Existen evidencias serológicas que indican mayor seroprevalencia de la infección en personas asmáticas que en aquellas libres de la enfermedad y que han dado pie a relacionar *C. pneumoniae* con la etiopatogenia del asma:

Poulakkainen y cols¹⁴. comunicaron que la prevalencia de la infección por *C. pneumoniae* había aumentado desde 1971 a la vez que se incrementaban los casos de asma sin que se hayan identificados nuevos neumóalergenos.

Recordemos el trabajo de Hahn y cols¹⁵⁸. publicado en 1991 con las primeras evidencias serológicas de asociación entre los síntomas asmáticos y las altas concentraciones de anticuerpos específicos polivalentes.

Miyashita y cols⁵³. además de analizar por MIF los valores séricos de IgG, IgM e IgA estudiaron, mediante cultivo y PCR, la presencia de *C. pneumoniae* en secreciones respiratorias de 168 adultos asmáticos con exacerbación y 108 individuos sanos. La prevalencia de ambas inmunoglobulinas fue significativamente mayor en el grupo de asmáticos (85.1% y 47.6% vs 67.6% y 16.7% $p < 0.001$). También las medias geométricas de los títulos de IgG e IgA fueron significativamente mayores (IgG: 38.8 vs 18.1 $p = 0.0001$; IgA: 17.2 vs 6.1 $p = 0.0001$). El 8.9% de los pacientes asmáticos con exacerbación tenían serología compatible con infección aguda por *C. pneumoniae*, frente al 2.8% de los no asmáticos ($p = 0.048$).

Pero también se han publicado trabajos donde no se observan diferencias de seroprevalencia entre asmáticos y no asmáticos:

En el estudio de Bjönssorn y cols²⁶⁰., anteriormente comentado, se encontraron relaciones entre la infección aguda y la presencia de sibilancias, pero no respecto a la prevalencia de asma entre los sujetos seropositivos, ni en la MGT de IgG de los asmáticos. Curiosamente si se encontró mayor prevalencia de infección por *C. trachomatis* y la MGT de IgG para *C. trachomatis* fue significativamente mayor en pacientes sintomáticos ($p < 0.01$).

Mills y cols²⁵². hallaron un resultado opuesto al esperado, en un estudio serológico caso-control con 96 pacientes asmáticos adultos jóvenes y niños (11-21 años) y 102 controles no diagnosticados de asma. La presencia de títulos elevados de IgG ($\geq 1:128$) fue mayor en el grupo control ($p = 0.046$). Tampoco se encontró asociación entre los títulos de IgG e IgA y la presencia de síntomas asmáticos en los 12 meses previos o con tener mayor

edad. Para los autores la infección por *C. pneumoniae* no suponen un riesgo mayor para el desarrollo del asma en niños y jóvenes, aunque no eluden el papel que puede jugar en las exacerbaciones y en un subgrupo de pacientes.

Routes y cols²⁵⁴. sugieren en una comunicación que los títulos aleatorios de IgG pueden ser útiles para identificar un subgrupo de pacientes adultos cuyo asma mejoraría con antibióticos específicos y estudian de forma paralela y retrospectiva, los sueros extraídos 46 pacientes asmáticos y 46 controles sin enfermedad que eran personal del hospital. No hubo diferencias en la prevalencia de títulos IgG ni en la MGT, incluso en el grupo control el porcentaje de sujetos con $IgG \geq 1:64$ fue ligeramente superior. No excluyen que *C. pneumoniae* pueda ser causa de exacerbaciones o del inicio del asma pero no apoyan la utilidad de elegir un título de IgG para seleccionar a los pacientes para tratamiento antibiótico.

En los estudios de seroprevalencia encontramos distintas variables de confusión como son: la localización geográfica, la presencia de epidemia, la edad, el sexo, hábito de fumador y una población control con una posible mayor frecuencia de infección. (hospitalaria, bomberos, policia)^{160,254,276}. Estas variables y los diferentes criterios para seleccionar los controles pueden influir en las diferencias de seroprevalencia.

La asociación entre los anticuerpos IgG y asma parece menos evidente que con los anticuerpos IgA, aunque hay estudios que continúan indicando dicha asociación. El estado de atopia y la edad de inicio de la enfermedad asmática también parecen influir en la seroprevalencia.

La elevación de anticuerpos en asmáticos puede ser reflejo de la asociación del asma con la respuesta Th2, de predominio alérgico (apartado 2.5.8. *Infección respiratoria y asma*) pero los títulos altos sólo se reflejan en adultos no en niños.

7.2. DISCUSIÓN DEL MÉTODO.

7.2.1. Población de estudio.

Como hemos visto, existen estudios a favor de la asociación de la infección por *C. pneumoniae* con la crisis asmática y a favor del tratamiento antibiótico específico. Pero este tratamiento debería instaurarse empíricamente, puesto que de momento el diagnóstico de la infección se basa en la respuesta serológica y no puede hacerse de forma inmediata. ¿Habría entonces que administrar antibióticos a todos los pacientes con crisis asmática?. Dependerá del riesgo de la infección para desencadenar una crisis y del porcentaje de población asmática afectada. Para ello es necesario conocer cuantos pacientes asmáticos sufren infección aguda sin acompañarse de exacerbación, además de la frecuencia de la infección en la población no asmática. Por esto analizamos los sueros de 65 pacientes asmáticos con exacerbación denominados grupo *agudos* y de 63 asmáticos asintomáticos o grupo *estables*. Partimos de la base de una hipótesis nula en la que esperábamos encontrar el mismo porcentaje de infecciones agudas en ambos grupos de asmáticos. Posteriormente estudiamos los sueros de 114 personas no asmáticas o controles para comprobar si existían realmente diferencias respecto a la población general y establecer así el perfil serológico de cada población.

7.2.2. Correlación de los criterios serodiagnósticos con la detección del microorganismo.

Debemos tener en cuenta que en todos los estudios, incluido el nuestro, que han utilizado la serología el diagnóstico es de presunta infección pues sólo detectando la bacteria mediante cultivo o PCR en tejidos u órganos que deben estar libres de

microorganismos, como es el tracto respiratorio inferior, podemos confirmar la invasión o infección aguda. El lento crecimiento, complejidad de las técnicas de aislamiento, la propia dificultad de *C. pneumoniae* para crecer respecto a las otras especies y para la visualización de los cuerpos elementales, dado su pequeño tamaño, no permiten utilizar el cultivo como técnica para el diagnóstico de rutina en el laboratorio. Hasta la fecha no se ha conseguido aislar la bacteria en el tracto respiratorio inferior de asmáticos. Aunque con la serología no podemos localizar el lugar de la infección, resulta poco práctico diagnosticar todos los casos con el empleo de técnicas invasivas como el lavado broncoalveolar o la biopsia pulmonar. Por otro parte la identificación por cultivo o PCR de *C. pneumoniae* no permite distinguir entre infección aguda o persistente, ni entre invasión o colonización si no se acompaña de la respuesta serológica correspondiente que debe ser evaluada en el contexto clínico. Los criterios epidemiológicos son necesarios y deben ser estudiados.

Por otra parte las discrepancias existentes entre los test serológicos, la PCR y los enzimoimmunoensayos con rDNA²⁸² reflejan las dificultades del diagnóstico rutinario de laboratorio de las infecciones por *C. pneumoniae* y la necesidad de optimizar el empleo de las diferentes técnicas diagnósticas.

Actualmente la microimmunofluorescencia específica o MIF es el método de referencia para el diagnóstico serológico de la infección por *C. pneumoniae*. La detección de anticuerpos por MIF es más lenta que por FC en el caso de la infección aguda por primera vez o primoinfección. La aparición de la fracción IgG específica tarda entre 4-8 semanas tras el comienzo de la enfermedad. La fracción IgM aparece a las 3-4 semanas en la primoinfección. En la reinfección o infección secundaria la respuesta de IgG es muy rápida, elevándose en la primera semana y alcanzando rápidamente valores altos $\geq 1:512$, sin que se detecte la presencia de IgM. La respuesta detectada por la FC es policlonal y se considera positiva la seroconversión o la presencia de un título policlonal $\geq 1:64$ pero no

distingue entre infección aguda, crónica o antigua. La respuesta policlonal de la FC puede además no ser detectada en las reinfecciones o aparecer a títulos muy bajos. Por lo tanto el único método específico para el diagnóstico de las reinfecciones es la MIF. Algunos investigadores también incluyen la presencia de IgA a títulos $\geq 1:256$ entre los criterios de infección aguda, considerando esta situación como una reactivación de una infección persistente o crónica. La elevación de una IgA preexistente en el suero ante una nueva agudización es inmediata, detectándose en la primera semana, pudiendo descender posteriormente a sus niveles previos^{120,218}.

Comentamos que en ambos grupos de asmáticos se tomaron dos muestras de suero con intervalo de 4 semanas pero en los no asmáticos sólo se hizo una extracción de sangre, por lo que no se han podido detectar seroconversiones en este grupo.

Se ha comprobado la sensibilidad para detectar la presencia de infección mediante MIF frente a la detección por PCR y cultivo, demostrando la presencia del organismo por PCR o cultivo entre en un 62% a un 75% de las personas con serología positiva y siendo negativa la detección de la bacteria en pacientes seronegativos^{140,147}. A su vez en un estudio realizado en adultos de edad media con neumonía y bronquitis, en los que se diagnosticó infección aguda por *C. pneumoniae* al detectar en un único suero valores de IgG $\geq 1:512$, se confirmó mediante PCR la presencia de la bacteria en la faringe de los pacientes⁵⁵. Otros estudios también han obtenido buena correlación de los criterios serológicos con la detección del organismo en cultivo^{94,283,284,285}. Aun así hay que tener en cuenta que un único suero con una concentración de IgG $\geq 1:512$ y ausencia de IgM en un sujeto asintomático puede indicar reinfección o persistencia de anticuerpos. Un 8% de las personas mayores de 65 años presenta títulos persistentes de IgG superiores a 1:512⁸⁶ y también se han documentado casos de persistencia de IgM durante varios meses.

En la población infantil por el contrario parece haber discrepancias ya que existen estudios en niños en los que se encontraba una significativa proporción de cultivos positivos persistentes pero sin presentar criterios serodiagnósticos de infección aguda^{286,287}. Puede ser debido a la administración previa de antibióticos o a la respuesta lenta de los anticuerpos, ya que se han observado respuestas muy tardías en las infecciones primarias e incluso ausencia de seroconversión^{94,137,215,286}. La escasez de diagnósticos serológicos en el grupo de edad de 0-5 años puede deberse a la pobre respuesta inmunológica ante infecciones asintomáticas o leves. La obtención de una tercera muestra de suero a los 30 días de la segunda aumentaría la sensibilidad de la serología para diagnosticar la infección aguda. En adultos jóvenes parece infrecuente la ausencia de respuesta inmunológica ante una infección por *C. pneumoniae* puesto que en dos amplios estudios controlados no se aisló la bacteria en los individuos que no presentaban respuesta de anticuerpos^{147,288}. El caso de niños con crisis asmática y cultivo positivo, la presencia de títulos serológicos no compatibles con infección aguda por *C. pneumoniae* puede indicar la existencia de una infección persistente o crónica asociada a un asma establecido, al que se ha añadido una infección viral causante de la exacerbación^{289,290}.

La presencia de títulos de IgG $\geq 1:512$ de forma persistente en individuos asintomáticos también pudiera reflejar una fuente de infección crónica no pulmonar¹²⁵, y por lo tanto la interpretación de un sólo título $\geq 1:512$ ha de hacerse de forma individualizada. Como hemos dicho, la seroprevalencia de anticuerpos IgG $\geq 1:512$ es mayor en personas mayores de 65 años, por lo que a la hora de valorar un único título elevado de IgG hay que tener en cuenta además de la presentación clínica, la edad del paciente. De todas formas dada la rapidez con que se eleva la IgG en las reinfecciones, lo habitual es que ya se haya producido dicho aumento cuando realizamos la extracción sanguínea al paciente y no detectemos la seroconversión.

7.3. DICUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las distribuciones de las concentraciones séricas para anticuerpos IgG e IgA de *C. pneumoniae* en cada una de las poblaciones estudiadas son mostradas en las figuras 14 y 15.

Figura 14. Distribución de las concentraciones de IgG.

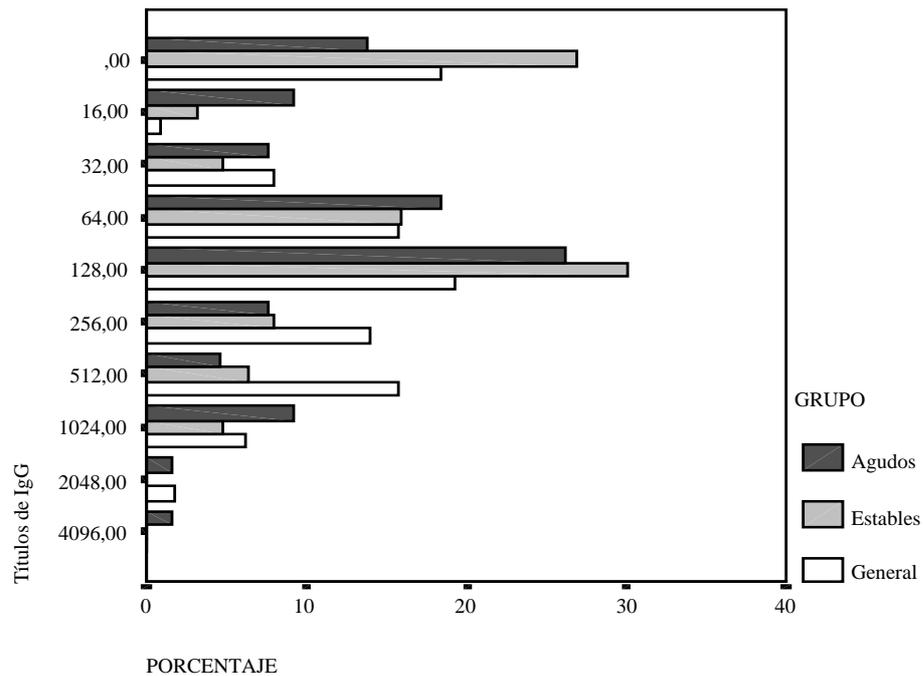
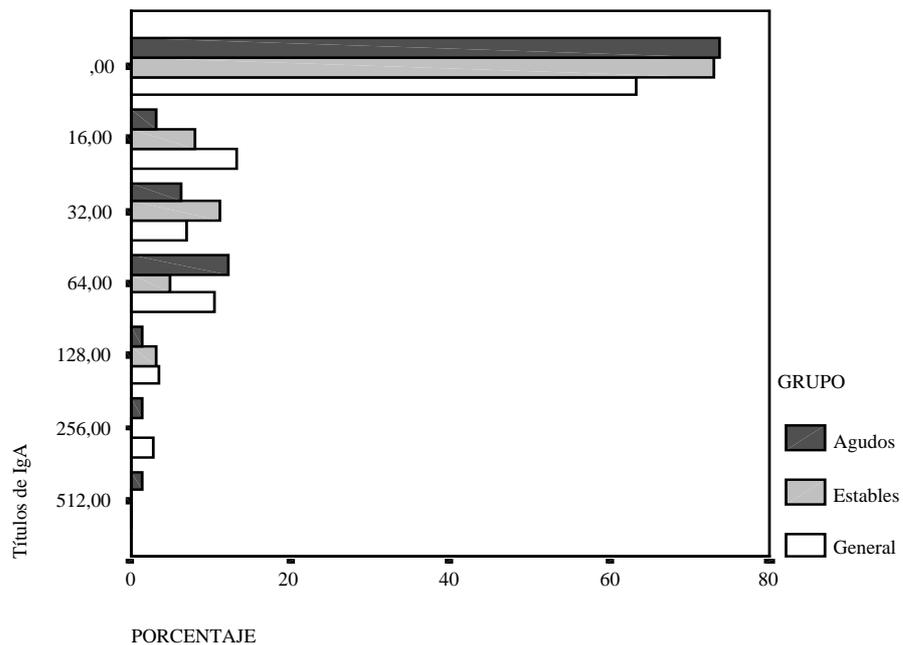


Figura 15. Distribución de las concentraciones de IgA.



No mostramos la distribución correspondiente a los anticuerpos IgM puesto que no se detectó ninguna IgM positiva en las poblaciones de asmáticos, y tan solo 5 casos positivos en la población general.

La distribución de los anticuerpos IgG es similar en las tres poblaciones, en la que observamos el agrupamiento de los títulos en torno al valor 1:128, pero destaca el menor número de sujetos con concentraciones elevadas, definitorias de infección aguda, en los pacientes asmáticos *estables*. También existe una diferencia destacada en los porcentajes de sujetos con títulos de IgG < 1:16 o negativos entre asmáticos *agudos* y *estables*.

La distribución de los anticuerpos IgA muestra ligeras desigualdades pero también destaca la ausencia de títulos altos, propios de infección aguda en los pacientes *estables*.

A continuación comentaremos detenidamente estas y otras diferencias encontradas.

7.3.1. Diferencias entre asmáticos con crisis y asmáticos estables.

En el análisis que realizamos entre grupos asmáticos, el porcentaje de sujetos con infección fue ligeramente superior entre los pacientes agudizados (86.1% vs 71.4% $p=0.05$). Los casos que presentaban serología compatible con infección aguda en asmáticos se consideraron reinfecciones, puesto que no se detectó la presencia de IgM en ninguno de ellos. Entre los pacientes con crisis asmática, 11 (17%) eran serológicamente compatibles con reinfección por *C. pneumoniae*, mientras que entre los asmáticos asintomáticos, tan sólo dos pacientes se consideraron compatibles con reinfección asintomática (3.2%). La cifra de posibles infecciones agudas en pacientes con crisis obtenida por nosotros es cercana a la obtenida por Peters y cols⁵⁴. (22%) y por Thom y cols⁵⁵. (19%). La diferencia de reinfecciones entre nuestros dos grupos de pacientes era fuertemente significativa ($p<0.05$) y el riesgo asociado de crisis asmática por posible reinfección, según los criterios que hemos utilizado, es 7 veces superior con respecto a la ausencia de infección aguda (OR

7.3 IC 95% 1.5-35.7) como vimos en la tabla 12 p.106. Este riesgo es similar al encontrado por Björsson y cols²⁶⁰ previamente mencionado. La proporción de crisis asmáticas que pueden atribuirse a la posible presencia de infección aguda-reinfección es en nuestra población asmática del 14% (Riesgo Atribuible 0.14 IC 95% 0.04-0.24).

Aunque no hicimos un seguimiento para comparar la serología de un mismo paciente entre el periodo de exacerbación y el asintomático, quisimos comprobar si los pacientes agudizados tenían más seroprevalencia de IgA que los asintomáticos. Los porcentajes de IgA positivas fueron prácticamente los mismos en ambos grupos, en torno a un 26%. Sí se observó que la MGT de IgA era superior en los pacientes agudizados (figura 9) aunque la diferencia con los asintomáticos tuvo ligera significación estadística (58.8 IC 95% 37.1-91.2 vs 34.6 IC 95% 23.9-48.9 p=0.05) Creemos que esta diferencia se debe a que existían 2 pacientes agudizados con posible reactivación de la infección e IgA \geq 1:256, que dispararían los títulos medios, mientras que en los asmáticos sin síntomas, los dos pacientes con reinfección eran IgA negativos. Sin embargo existía un riesgo asociado entre ser paciente del grupo *agudos* y tener títulos de IgA \geq 1:64 que permaneció significativo tras el ajuste por edad, sexo y hábito de fumador (OR 12.5 IC 95% 1.2-126.2; p=0.03). El intervalo de confianza resulta demasiado amplio debido al pequeño tamaño de la muestra y a la falta de linealidad de la variable IgA al ser una variable de intervalo y de carácter geométrico. Como vimos en el apartado 3.7.3.2., *Infección crónica*, aunque se considere a IgA marcador de cronicidad, aún no se ha podido establecer a partir de que valor podemos establecer que existe infección persistente por *C. pneumoniae* y su repercusión en la etiopatogenia del asma y la actividad de la enfermedad.

No hubo diferencias de medias de los títulos de IgG entre asmáticos agudizados y asintomáticos, ni relación de alguno de los grupos con la presencia de títulos altos de IgG \geq 1:128.

Nuestra población asmática contenía 87 pacientes considerados no atópicos o intrínsecos y 41 atópicos o extrínsecos. La seroprevalencia de IgG fue curiosamente algo más elevada en extrínsecos, pero sin ser significativamente diferente (83% vs 77% $p=0.44$). La seroprevalencia de IgA fue superior en intrínsecos pero tampoco tuvo significación estadística (29.8% vs 23.5%). En cuanto a la relación con títulos altos, los pacientes intrínsecos presentaron MGT tanto de IgG como de IgA más elevadas, pero la diferencia de medias sólo fue significativa para IgA (50.1 vs 25.1 $p<0.05$). Estos datos difieren con los expuestos previamente Von Hertzen²⁵¹ y Hahn²⁵⁵. En ambos trabajos las seroprevalencias tanto de IgG como de IgA son superiores en intrínsecos, así como sus respectivas medias geométricas, y existían diferencias significativas entre pacientes no atópicos y atópicos respecto a la edad, hábito de fumador y el sexo. En ambos estudios se realizaron estudios de regresión para ajustar las variables de confusión. Es posible que con un mayor número de pacientes pudiéramos detectar diferencias significativas en las seroprevalencias, especialmene de IgA. Respecto a los títulos de IgG sólo podemos hablar de una tendencia a títulos más altos en los intrínsecos. Si esta tendencia pudiera confirmarse en una muestra amplia, estaría a favor de la relación con el asma de inicio posterior a una infección aguda. En cuanto a la presencia significativa de un título medio de IgA mayor en intrínsecos, estaría de acuerdo con la idea de infección crónica como iniciadora de la enfermedad asmática en adultos y el asma asociada a infección. Sin embargo, a pesar de ser una relación significativa, el número total de pacientes con IgA positiva era muy pequeño (34) por lo que también convendría confirmar esta relación con mayor número de casos.

Con respecto al tiempo de evolución, no obtuvimos diferencias en la seroprevalencia de IgG pacientes de larga-duración (>10 años), corta-evolución (1-10 años) y recientes (<1 año) a diferencia del trabajo de Von Hertzen²⁵¹ que relacionaba una mayor seroprevalencia

de IgG e IgA y un riesgo asociado de tener títulos altos de IgG ($\geq 1:128$) en pacientes de larga-duración (>7 años). En este estudio el número de casos estudiados era bastante superior al nuestro aunque sólo divide en dos categorías, larga-duración y corta-duración. Para aumentar el tamaño de la muestra, agrupamos los pacientes de corta-duración con los recientes pero tampoco obtuvimos diferencias con respecto a los de larga duración. Por el contrario sí obtuvimos diferencias en el estudio de las medias geométricas de los títulos de IgG, de tal forma que los pacientes con <1 año de evolución tenían la MGT más alta, seguida por los de más de 10 años de evolución y por último por aquellos entre 1-10 años de evolución. Las diferencias de medias fueron significativas, especialmente entre 1-10 años y <1 año ($p=0.0001$) y entre >10 años y 1-10 años ($p=0.01$). Entre <1 año y >10 años la diferencia fue menor ($p=0.05$). Destacamos que los pacientes recientes o de menos de 1 año de evolución tuvieron los títulos más altos siendo la mediana de 512.

La presencia de IgA fue positiva en el 46.6% de los pacientes recientes, frente al 27% y el 20% de los de larga y corta-duración. Esta diferencia no fue significativa ($\chi^2=4.0$ $p=0.13$) probablemente debido al escaso número de pacientes recientes (15) y de IgA positivas en total (34). Tampoco se detectaron diferencias entre las medias de los títulos de IgA.

La presencia de títulos altos en los pacientes con menos de un año de evolución pudiera estar en relación con el desarrollo de un asma asociado a una infección aguda y reciente por *C. pneumoniae*. En nuestro caso cuatro pacientes de 34, 22, 15 y 75 años que presentaron crisis asmática y posible reinfección pertenecían a la categoría recientes. Tres de ellos referían antecedentes de infección respiratoria, previa al desarrollo del asma y en un caso con broncoespasmo. Dos de estos pacientes presentaban fiebre en el momento de la crisis y títulos de IgA superiores a 1:256, lo que indica también la posible reactivación de una infección persistente.

Por otro lado la diferencia de medias entre pacientes de larga-duración y corta-duración puede tener relación con un mayor tiempo de exposición y mayor número de reinfecciones. Destacamos que la mayoría de los pacientes asmáticos considerados reinfección, y por lo tanto con títulos de IgG $\geq 1:512$ era pacientes de larga-duración (9 pacientes) y la ausencia de pacientes de corta-duración. Esto probablemente influya en el aumento de la media en los pacientes de larga-duración.

En nuestra población asmática la mayoría de los pacientes clasificados como persistentes graves y los 4 únicos pacientes corticodependientes se encontraban en el grupo de pacientes agudizados. Por el contrario entre los pacientes asmáticos asintomáticos predominaron los pacientes persistentes leves y con asma intermitente (tabla 11 p.104). En un principio no se detectó ninguna asociación entre las distintas categorías de gravedad y los títulos de IgG o IgA, ni hubo diferencias entre medias. Puesto que el número de casos era muy pequeño, incluso cero en alguna de las categorías, los pacientes se agruparon en mayor gravedad o grupo A, que incluía a los persistentes graves, corticodependientes y persistentes moderados y menor gravedad o grupo B con pacientes persistentes leves e intermitentes. Curiosamente la seroprevalencia de IgG fue ligeramente superior en el grupo de menor gravedad, aunque sin significación estadística. La presencia de títulos altos de IgG ($\geq 1:128$) no fue asociada con ninguno de los grupos. Tampoco en la seroprevalencia de IgA. En principio nuestros datos no apoyan la relación entre los títulos altos de anticuerpos IgG o la presencia de IgA con la gravedad del asma.

No sabemos si la relación y el riesgo encontrados en nuestro estudio entre los valores de IgA $\geq 1:64$ y los pacientes con crisis asmática tiene que ver con la posible relación entre infección crónica y mayor gravedad de la enfermedad manifestada por otros autores, ya que entre los pacientes agudizados predominaban los de asma persistente grave. Entre los 17 pacientes agudizados con IgA positiva, 13 pertenecían al grupo A de mayor gravedad (7

persistentes graves, 6 persistentes moderados) y 5 persistentes leves. En el grupo de asintomáticos, también con 17 pacientes IgA positiva, predominaron los pacientes persistentes leves (4 persistentes graves, 5 persistentes moderados y 8 persistentes leves). En los pacientes con asma intermitente no se detectó la presencia de IgA. Por otro lado los 2 asmáticos asintomáticos con posible reinfección eran IgA negativos. Quizás exista una relación entre la presencia de IgA y la gravedad del asma, pero puesto que la seroprevalencia de IgA en nuestra población asmática no ha sido muy grande, puede que también sea necesario aumentar el número de pacientes para detectar diferencias y hacer un seguimiento serológico y clínico.

Por lo tanto nuestros datos indican que existen evidencias serológicas de la presencia de infección aguda por *C. pneumoniae* asociada a crisis asmática. El riesgo de asociación es muy alto y afecta a una moderada proporción de la población asmática. De esta forma planteamos la necesidad de estudiar si la adición de antibióticos con actividad frente a *C. pneumoniae* al tratamiento habitual de las exacerbaciones asmáticas sería útil y determinar que grupos de pacientes, en función de la enfermedad subyacente, se beneficiarían de la antibioterapia empírica.

Puesto que no hemos hecho estudios comparativos con respecto a otros agentes infecciosos causantes de exacerbaciones como *Mycoplasma pneumoniae* o virus respiratorios admitimos la posibilidad de coinfección, pero hemos visto cómo estudios previos han demostrado una frecuencia de infección por *C. pneumoniae* al menos tan importante como la infección viral.

7.3.2. Diferencias entre asmáticos y no asmáticos.

Los porcentajes de infección que obtuvimos en pacientes asmáticos agudizados y en los controles no asmáticos fueron similares (86.1% y 81%). La seroprevalencia de

infección aguda fue superior en los asmáticos con crisis (17% vs 13.2%), pero no existía mayor riesgo de padecer infección aguda en los pacientes con crisis respecto a los no asmáticos (OR 2.2 IC 95% 0.6-7.3 $p>0.05$). En esto nos diferenciamos del trabajo previamente mencionado de Miyashita y cols⁵³. en el que sí existían diferencias significativas entre asmáticos con exacerbación y no asmáticos. Sin embargo tenemos que recordar el trabajo de Cook y cols²⁷⁶., realizado con 123 asmáticos agudizados y 1518 controles, en el que tampoco se hallaron diferencias entre los casos y los controles. Quizás hay que tener en cuenta que el grupo control se componía de pacientes hospitalizados. Por otro lado en una comunicación de Weiss²⁹¹ con adultos que presentaban broncoespasmo y controles asintomáticos, con edades comprendidas entre 18-79 años, la presencia de IgG fue ligeramente superior en el grupo control (87% vs 92%). Es de destacar una alta seroprevalencia en el grupo control.

Con respecto a los pacientes *estables*, el porcentaje de infección fue inferior al de los sujetos no asmáticos (73% y 81%). También era menor el porcentaje de infección aguda (3.2% vs 13.2%). Esta diferencia en un principio fue significativa pero tras aplicar la corrección de continuidad al número de observaciones, por ser estas reducidas, la significación desapareció (tabla 14 p.112). Otros autores también encontraron una seroprevalencia de IgG ligeramente superior en controles no asmáticos cuando se comparaba con pacientes asmáticos no agudizados o asintomáticos. Larsen y cols²⁹². examinaron 22 sueros de pacientes adultos con asma estable y 25 sueros de controles sin asma. Plantean que si *C. pneumoniae* tiene un papel en el inicio de la enfermedad asmática, las personas asmáticas tendrán mayor seroprevalencia de IgG y títulos más elevados que los sujetos no asmáticos. También evaluaron la presencia de IgE específica y la capacidad de *C. pneumoniae* para inducir la suelta de histamina. El 22% de los asmáticos tuvieron IgG positiva frente al 24% de los controles. No hubo diferencias en las concentraciones de

IgG ni en la detección de IgE. Tampoco detectaron que la bacteria tuviera capacidad para aumentar la liberación de histamina en los basófilos. Los autores, en su artículo, no apoyan la teoría de la infección por *C. pneumoniae* como inicio del asma.

En el trabajo de Miyashita⁵³ la presencia de IgA fue significativamente mayor en los pacientes con crisis asmáticas respecto a los controles no asmáticos. En nuestro caso, los resultados fueron contrarios, puesto que se detectaron más IgA positivas en los controles respecto a ambos grupos de asmáticos, *agudos* y *estables* (36.8% vs 26.1% y 26.9% $p>0.05$) y la frecuencia de infección crónica fue mayor en el grupo *general*, pero sin ser significativa la diferencia respecto a los asmáticos (*general* 34.2%, *agudos* 20%, *estables* 27%, $p>0.05$). Por lo tanto y en principio, nuestros resultados no indican que exista mayor seroprevalencia de infección crónica en los pacientes asmáticos de nuestra Área. Sin embargo esto no contradice que aquellos pacientes asmáticos que tengan una infección crónica o persistente por *C. pneumoniae*, pudieran verse afectados en la gravedad de su enfermedad de base, o que dicha infección pueda favorecer el desarrollo posterior de una asma en sujetos con predisposición.

La serología compatible con infección antigua fue mayor en ambos grupos asmáticos, *agudos* (49.2%) y *estables* (41.3%), con respecto a los sujetos no asmáticos o grupo *general* (34.2%) pero la diferencia no fue significativa.

Con respecto a las concentraciones de IgG e IgA, la MGT de IgG fue superior en el grupo control *general*, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. En cuanto a los títulos de IgA, y como sucedía en el análisis entre grupos asmáticos, *agudos* continúan teniendo la mayor MGT pero la diferencia tampoco alcanzó significación estadística (figura 13 p.113).

Estos datos están de acuerdo con los hallados por autores que no encontraron diferencias entre seroprevalencias ni con respecto a los títulos elevados de anticuerpos^{252,254,260}.

En los estudios de seroprevalencia no siempre se han utilizado los mismos criterios para definir los casos de asma en virtud de la función pulmonar o para escoger los grupos control obteniendo hallazgos a favor y en contra de la asociación. Nuestro grupo control de sujetos no asmáticos estaba compuesta por 56 donantes de sangre y 58 personas que habían acudido a las consultas externas del hospital o estaban ingresados por causas no relacionadas con enfermedades cardiovasculares o respiratorias.

Existen antecedentes de una alta seroprevalencia de infección entre donantes de sangre. Recordemos el estudio realizado en Suecia por Boman y cols¹²⁵ comentado en el apartado 3.5.2.1. *Infección de los monocitos y macrófagos*, p.49, para identificar pacientes con enfermedad cardiovascular portadores de *C. pneumoniae* en células mononucleares de sangre periférica mediante PCR. Se analizaron las sangres de 101 pacientes sospechosos de enfermedad coronaria y de 52 controles sanos, donantes de sangres de mediana edad. (media = 49). En casi el 60% de los pacientes sospechosos de enfermedad coronaria y en el 46% de los donantes de sangre se confirmó la presencia de DNA bacteriano en sangre periférica. También se analizaron los sueros por MIF para detectar la presencia de IgG, IgA e IgM. Los resultados serológicos dieron un 94% de IgG positivas en los pacientes coronarios y un 90% en los donantes de sangre. Los porcentajes de IgA también fueron altos en ambos, 84% en enfermos y 77% en los sanos. Hubo 3 IgM positivas entre los 101 pacientes cardiovasculares y 2 entre los 52 donantes de sangre. Los autores plantean que son necesarios estudios que determinen si estos pacientes y los donantes de sangre albergan la bacteria de forma viable e infecciosa y si la detección de DNA bacteriano circulante sería útil para monitorizar la eficacia del tratamiento.

Por otro lado en una comunicación de Blasi y cols²⁹³. se exponen las diferencias significativas ante la presencia de títulos de IgG $\geq 1:64$ en 120 pacientes asmáticos adultos (34%) frente a 163 controles donantes de sangre (22%), ($p=0.03$), aunque no se detectó por PCR la presencia de la bacteria en los pacientes controles, los pacientes asmáticos con PCR positiva fueron pocos y con escasa significación ($p=0.059$).

Respecto a los controles que provenían del hospital aunque en algunos casos, como el estudio de Cook y cols²⁷⁶., se ha planteado si representaban un grupo de riesgo para tener infección por *C. pneumoniae*, no existen trabajos demostrando dicha hipótesis respecto a este colectivo, ni respecto a otros como el personal sanitario, policías o bomberos.

Parece que existen diferencias de seroprevalencia y en la media de los títulos de anticuerpos entre sexos. Varios estudios han mostrado valores de IgG más altos en los hombres así como mayor frecuencia de infección (ver apartado 3.4. *Epidemiología*). Estas diferencias se mantienen incluso después de controlar el hábito de fumador¹⁰¹. En nuestro estudio el número de mujeres fue superior de forma significativa al de hombres en los tres grupos (hombres: *agudos* 75.3%, *estables* 65%, *general* 52.6% vs mujeres: 24.6%, 34.9% y 47.3% $p<0.05$). Pero en el grupo *general* hubo un mayor número de hombres, también de forma significativa respecto a los grupos asmáticos. Esto podría explicar que el colectivo *general* tuviera una media geométrica de IgG más alta. De hecho la MGT de IgG fue superior en el conjunto de hombres respecto a las mujeres aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (158.4 IC 95% 125.8-199.5 vs 125.8 IC 95% 102-151.3 $p>0.05$).

También existe una diferencia significativa en la media de edad entre los grupos *agudos* y *general* (49.4 vs 39 $p<0.05$). Las mayores frecuencias de infección por *C. pneumoniae* se dan en la infancia, en torno a los 9 años, predominando la primoinfección y en la vejez, a partir de los 70, fundamentalmente en forma de reinfección. Entre ambos

picos la incidencia aumenta lentamente con la edad, así como las reinfecciones. El grupo *agudos* tuvo una seroprevalencia de infección algo mayor que el grupo *general*. Esta diferencia no era significativa, en contraste con lo observado en los colectivos *agudos* y *estables*. La diferencia de edad entre *agudos* y *general* creemos que no es lo suficientemente grande como para influir en los resultados serológicos, aunque resaltamos la presencia de 5 sujetos no asmáticos con IgM positiva y por lo tanto primoinfección. Aun así, todos los resultados referentes a la distribución de frecuencias fueron ajustados por edad, sexo y hábito de fumador.

Por último destacamos que la seroprevalencia de la infección es muy alta en los tres grupos estudiados por nosotros con un porcentaje total de seropositivos superior al 80% sobre el total de sujetos. Como hemos visto en el apartado de epidemiología *C. pneumoniae* posee una amplia distribución pero pueden existir diferencias de seroprevalencia entre distintas zonas geográficas, incluso dentro de una misma región. En un estudio realizado en un hospital del Norte de Madrid, para determinar la frecuencia de la infección por *C. pneumoniae* como agente de neumonías, se encontró una seroprevalencia total de IgG del 64.5%. Puesto que el estudio se hizo con enfermos sintomáticos y la infección por *C. pneumoniae* habitualmente es asintomática, es posible que la seroprevalencia de la infección en la población general de aquella zona sea mayor.

La seroprevalencia como hemos dicho también aumenta con la edad y en nuestro país existen zonas, como el País Vasco, que presentan una estimable frecuencia de infección en niños mayores de 7 años (40%)¹⁰⁶, lo que sugiere que este porcentaje posiblemente sea alto en la población adulta de dicha zona.

Las altas seroprevalencias obtenidas en nuestro estudio indican que la exposición al microorganismo es muy frecuente en nuestra área. Queda por determinar cuantos de los sujetos con serología positiva serían además portadores de *C. pneumoniae*, y ver si hay

diferencias entre grupos. Estudios previos indican que entre un 2-5% de la población sana asintomática, determinado por PCR o cultivo, es portadora de *C. pneumoniae*²⁷⁴. Por otro lado sería útil, aunque complejo, el seguimiento en el tiempo de los sujetos no asmáticos, con y sin infección por *C. pneumoniae*, incluyendo niños y teniendo en cuenta todos los posibles factores de confusión, en el que se pueda determinar si existe una relación causa-efecto entre la infección por *Chlamydia pneumoniae* y la aparición del asma.

8. CONCLUSIONES

1. Rechazamos la *hipótesis nula* y manifestamos que existe una relación significativa entre la presunta infección aguda por *C. pneumoniae* y la presencia de crisis asmática. El riesgo de asociación entre ambos factores es alto y aplicable a un 14% de la población asmática de nuestra Área.
2. El perfil serológico obtenido de la población asmática estudiada indica que puede existir una relación entre la infección persistente por *C. pneumoniae* y el inicio del asma en el adulto, así como el desarrollo de la enfermedad asmática tras una infección reciente por *C. pneumoniae*. También indica una mayor incidencia de reinfección en los pacientes con asma de larga evolución.
3. La seroprevalencia de la infección por *C. pneumoniae* es muy alta en las tres poblaciones estudiadas, lo que significa que existe una alta tasa de exposición al agente infeccioso en nuestra Área.
4. La seroprevalencia total de la infección y las concentraciones medias de IgA tienden a ser mayores en los sujetos asmáticos con crisis asmática, sin embargo actualmente no podemos establecer que en nuestra Área existan diferencias significativas de seroprevalencia entre asmáticos y no asmáticos. Se necesitan amplios estudios de seguimiento de la población no asmática que ayuden a determinar si realmente hay una relación entre la infección por *C. pneumoniae* y el desarrollo posterior del asma.

Finalmente, proponemos la realización de un estudio para valorar el beneficio de la antibioterapia específica empírica en el tratamiento de las crisis asmáticas.

9. BIBLIOGRAFIA.

- ¹. American Thoracic Society Committee on Diagnostic Standards. Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1962;85:762-79.
- ². American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225-44.
- ³. National Heart, Lung and Blood Institutes. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention NHLBI/WHO Workshop report. NIH Pub N° 95-3659; 1996 May.
- ⁴. Siegel SC. History of asthma death from antiquity. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:458-62.
- ⁵. Panlozzi LJ, Coleman JJ, Buist AS. A recent increase in asthma mortality in the Northwestern United States. *Ann Allergy* 1984;56:392-5.
- ⁶. Lorenz J. Epidemiological and clinical aspects of asthma. *Eur Respir Rev* 1996;6:218-23.
- ⁷. Centers for Disease Control. Asthma-United States, 1980-90. *JAMA* 1992;268:1995-9.
- ⁸. Aberg N. Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin Exp Allergy* 1989;47:529-32.

-
9. Burney PG, Chinn S, Rona RJ. Has the prevalence of asthma increased in children?. Evidence national study of health and growth 1973-86. *Br Med J* 1990;300:1306-10.
 10. Burr ML. Is asthma increasing? *J Epidemiol Community Health*; 41:185-9.
 11. Charpin D, Kleisbauer JP, Lanteaume A, Razzouk H, Vervloet D, Toumi M, y cols. Asthma and Allergy to house-dust mites in populations living in high altitudes. *Chest* 1988;93:758-61.
 12. Peat JK, Woolcock AJ. Sensitivity to common allergens: relation to respiratory symptoms and bronchial hyperresponsiveness in children from three different climatic areas of Australia. *Clin Exp Allergy* 1991;21:573-81.
 13. Tager IB. Passive smoking-bronchial responsiveness and atopy. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:507-9.
 14. Poulakkainen M, Ukkonen P, Saikku P. The seroepidemiology of *Chlamydia* in Finland over the period 1971-1987. *Epidem Inf* 1989;339:287-95.
 15. Hunt LW, Silverstein MD, Reed CE, O'Connell EJ, O'Fallon WM, Yunginger JW. Accuracy of certification of deaths due to asthma. A national study. *JAMA* 1993;269:1947-52.
 16. Buist S. Asthma mortality: what have we learned?. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:275-83.
 17. Gerritsen J, Koeter GH, Postma DS, Schouten JP, Knol K.. Prognosis of asthma from childhood to adulthood. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1325-30.
 18. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:893-103
 19. Holgate S. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* 1993;48:103-9.

-
20. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 1992;47:450-455.
21. Robinson DS, Hamid Q, Sun Y, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, y cols. Predominant Th2-type bronchoalveolar lavage T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
22. Kemeny DM, Díaz-Sanchez D, Holmes BJ. CD8+ T cells in allergy. *Allergy* 1992;47:12-21.
23. Montefort S, Holgate ST, Howarth PH. Leucocyte-endothelial adhesion molecules and their role in bronchial asthma and allergic rhinitis. *Eur Respir J* 1993;6:1044-54.
24. Barnes PJ, Baraniuk Jn, Belvisi MG. Neuropeptides in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1187-98,1391-9.
25. Cheung D, Timmers MC, Zwinderman AH, den Hartigh J, Dijkman JH, Sterk DJ. Neutral endopeptidasa activity and airway hyperresponsiveness to neurokinin A in asthmatic subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1467-73.
26. Kharitonov SA, Yate D, Robbins RA, Logan R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
27. Bousquet J, Chanez P, Lacoste, Barneon G, Ghavanian N, Enander I y cols. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323:1033-19
28. Bousquet J, Chanez P, Campbell AM, Vignola AM, Godard P. Cellular inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25 Sppl 2:39-42.
29. Pesci A, Foresi A, BertorelliG, Chetta A, Oliveri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propia of bronchial biopsies from asthmatics and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:684-9.

-
30. Brewtser CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Molecular Biol* 1990;3:507-11.
31. Wilson JW, Li X. The measurement of subepithelial and submucosal collagen in the asthmatic airways. *Clin Exp Allergy* 1997;27:363-71.
32. Bousquet J, Chanaz P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, y cols. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 1992;47:3-11.
33. Douglas NJ. Nocturnal asthma [editorial]. *Thorax* 1993;48:100-2.
34. Smith JM. Asthma and atopy as diseases of unknown cause. A viral hypothesis possibly explaining the epidemiologic association of the atopic diseases and various forms of life. *Ann Allergy* 1994;72:156-62.
35. Hahn DL, McDonald R. Infectious asthma and *Chlamydia pneumoniae* IgA antibody. *Wisc Med J* 1995;94:682.
36. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin J. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
37. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, y cols. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *Br Med J* 1997;314:999-1003.
38. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DH, Yeyes CB, Shiell AW, y cols. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
39. Bodner C, Godden D, Seaton A. Family size, childhood infections and atopic diseases: The Aberdeen WHEASE group. *Thorax* 1998;53:28-32.

-
- 40 Sudo N, Sawamura SA, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997;159:1739-45.
- 41 Dold S, Heinrich J, Wichmann HE, Wist M. Ascaris specific IgE and allergic sensitización in a cohort of school children in the former East Germany. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:413-20.
- 42 Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Samalalcombe TB, Loh R, Sly PD, y cols. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-7.
- 43 Douglas JA, O'Hehir RE. What determines asthma phenotype?. *Am J Respir Crit Care* 2000;161 (3 Suppl 1):S211-14.
- 44 Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, y cols. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995;310:1225-8.
- 45 Gobernado M. Asma y *Chlamydia pneumoniae*. *Rev Esp Quimioterapia* 1999;12 Suppl 1;15-24.
- 46 Horn ME, Reed SE, Taylor P. Role of viruses and bacteria in acute wheezy bronchitis in childhood: A study of sputum. *Arch Dis Chil* 1979;118:587-92.
- 47 Martinez FD. Role of viral infection in the inception of asthma and allergies during childhood: Could they be protective?. *Thorax* 1994;49:1189-91.
- 48 Allegra L, Blasi F, Centanni I, Consentini R, Denti F, Raccanelli R y cols. Acute exacerbations of asthma in adults: Role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J* 1994;7:2165-8.

-
49. McIntosh TE, Ellis EF, Hoffman LS. The association of viral and bacterial respiratory infections with exacerbations of wheezing in young asthmatic children. *Pediatrics* 1983;82:579-90.
50. Beasley R, Coleman DE, Hermon Y, Holst PE, O'Donnell TV, Tobias M. Viral respiratory tract infection and exacerbations of asthma in adult patients. *Thorax* 1988;43:679-683.
51. Atmar RL, Guy E, Guntupalli KK, Zimmerman JL, Bandi VD, Baxter BD, Greenberg SB. Respiratory tract viral infections in inner-city asthmatic adults. *Arch Intern Med* 1998;158:2453-9.
52. Nicholson KG, Kent K, Ireland DC. Respiratory virus and exacerbation of asthma in adults. *Brit Med J* 1993;307:982-6
53. Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M, Niki Y, Kawane H, Matsushima T. *Chlamydia pneumoniae* and exacerbations of asthma in adults. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;80:405-9.
54. Peters BS, Thomas B, Marshall B, Weber J, Taylor D, Shaw R. The role of *Chlamydia pneumoniae* in acute exacerbations of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:A341.
55. Thom D, Grayston J, Campbell L, Kuo C, Diwan V, Wang S. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:785-92.
56. Buckmaster N, McLaughlin P, Tai E, Holmes P. Exacerbation or initiation of asthma by *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Am Rev Respir Dis* 1993;147 Suppl 2:380.
57. Gil JC, Mayagoitia BG, Paz MD. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from asthmatic patients. *Ann Allergy* 1993;70:23-5.

-
- ⁵⁸. Emre U, Roblin PM, Gellin M, Dumornay W, Rao M, Hammerslag MR, y cols. The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airway disease in children. Arch Pediatr Adoles Med 1994;148:727-32.
- ⁵⁹ Kamekasi S, Suehiro Y, Shinomiya K, Matsushima H, Ouchi K. *Chlamydia pneumoniae* infection in children with asthma exacerbation. Jpn J Allergol 1998;47:667-73.
- ⁶⁰. Freymuth F, Vabret A, Brouard J, Toutain F, Verdon R, Petitjean J, y cols. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. J Clin Virol 1999; 13:131-139.
- ⁶¹. Kraf M, Cassell GH, Henson JE, Watson H, Williamson J, Marmion BP, y cols. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the airways of adults with chronic asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:998-1001.
- ⁶² Johnston SL, Papi A, Bates PJ, Mastrorarde JG, Monick MM, Hunninghake GW. Low grade rhinovirus infections induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium. J Immunol 1998;160:6172-81.
- ⁶³ Cheung D, Dick EC, Timmers MC, Klerk EP, Spaan WJM, Sterk PL. Rhinovirus inhalation causes long-lasting excessive airway narrowing in response to methacoline in asthmatic subjects in vivo. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:1490-6.
- ⁶⁴ Gern JE, Calhoun W, Swenson C, Shen G, busse WW. Rhinovirus infection preferentially increases lower airway responsiveness inn allergic subjects. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1872-6.
- ⁶⁵. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. . Asthma and wheezing in the first six years of life. N Engl J Med 1995;332:133-8.

-
- ⁶⁶ Openshaw PJM, O'Donnell DR. Asthma and the common cold: can viruses imitate worms? *Thorax* 1994;49:101-3.
- ⁶⁷ Bello S. Clamidas y patología respiratoria. *Arch Bronconeumol* 1997;33:527-40.
- ⁶⁸ Hogg JC. Adenoviral infection and childhood asthma. *Am J Respir Crit care Med* 1994;150:2-3.
- ⁶⁹ Hahn DL, McDonald R. Can acute *Chlamydia pneumoniae* infection initiate chronic asthma?. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:339-44.
- ⁷⁰ Hahn DL. Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection in adult: A before-after trial. *J Fam Pract* 1995;41:345-51.
- ⁷¹ Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A polymorphism in the 5'-flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels with total serum IgE. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976-83.
- ⁷² Burrows B, Martinez FD, Halonene M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320:271-7.
- ⁷³ British Thoracic Society, Brit. Paediatric Association, Research Unit of the Royal College of Physicians of London, King's Fund Centre, National Asthma Campaign, Royal College of General Practitioners, y cols. The Guidelines on the management of asthma. *Thorax* 1993;48 Suppl 2:S1-24.
- ⁷⁴ Picado C, Benlloch E, Casan P, Duce F, Manresa F, Perpiña M, y cols. Recomendaciones para el tratamiento del asma en los adultos. *Arch Bronconeumol* 1993;29 Suppl 2:8-13.

-
75. Grupo de trabajo en Asma Infantil. Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Protocolo de tratamiento del asma infantil. *Ann Esp Pediatr* 1995;43:439-46.
76. Barnes PJ. Immunomodulation as asthma therapy: Where do we stand?. *Eur Respir J* 1996;22 Suppl :154-9.
77. Oehling A. Bacterial immunotherapy in bronchial asthma. *J Investig Allergol Clin Immuol* 1997;7:14-9.
78. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol* 1986;24:1034-7.
79. Dwer RS, Treharne JD, Jones BR, Herring J. Chlamydial infection. Results of micro-immunofluorescens test for detection of type-specific antibody in certain Chlamydial infections. *Br J Vener Dis* 1972;48:525-59.
80. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *N Engl J Med* 1986;315:161-8.
81. Saikku P, Wang SP, Kleemola M, Brander E, Rusanen E, Grayston JT. An epidemic of mild pneumonía due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*. *J Infect Dis* 1985;151:832-9.
82. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia sp* strain TWAR. *Int J Syst bacteriol* 1989;39:88-90.
83. Everett K, Bush R, Andersen A. Emended description of the order Chamydiales, proposal of *ParaChlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415-40.

-
84. Everett K, Andersen A. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia spp.* Int J Syst Bacteriol 1997;47:461-73.
85. Gaydos CA, Pallmer L, Quinn TC, Falkow S, Eiden JJ. Phylogenetic relationship of *Chlamydia pneumoniae* to *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* as determined by analysis of 16S ribosomal DNA sequences. Int J Sys Bacteriol 1993;43:610-2.
86. Kuo CC, Jackson L, Campbell L, Grayston T. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995 Oct:451-61.
87. Campbell LA, Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol 1999;28:1261-4.
88. Iijima Y, Miyashita N, Kishimoto T, Kanamoto Y, Soejima R, Matsumoto A. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans. J Clin Microbiol 1994;32:583-8.
89. Melgosa MP, Kuo CC, Campbell A. Isolation and characterization of a gene encoding a *Chlamydia pneumoniae* 76-kilodalton protein containing a species-specific epitope. Infect Immun 1994;95:499-504.
90. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families 1966-1979. J Infect Dis 1992;166:646-9.
91. Theunissen HJ, Lemmens NA, Burggraaf A, Soltz E, Michel MF. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *C. pneumoniae* in aerosols. Appl Environ Microbiol 1993;59:258-9.

-
- ⁹². Falsey AR, Walsh EE. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* in young children in a Japanese family. *J Infect Dis* 1990;162:1390-2.
- ⁹³. Chirgwin K, Roblin Pm, Gelling M, Hammerschlag MR, Schachter J. Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. *J Infect Dis* 1991;163:757-61.
- ⁹⁴. Ekman MR, Grayston JT, Visakorpi R, Kleemola MM, Kuo CC, Saikku P. An epidemic of infections due to *Chlamydia pneumoniae* in military conscripts. *Clin Infect Dis* 1993;17:420-425.
- ⁹⁵. Gnarpe J, Gnarpe H, Sundelof B. Endemic prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy persons. *Scand J Infect Dis* 1991;23:387-388.
- ⁹⁶. Falck G, Gnarpe J, Gnarpe H. Prevalencia of *Chlamydia pneumoniae* in healthy children and in children with respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:549-554.
- ⁹⁷. Lie De-Bun, Daling JR, Wang SPk, Grayston JT. Evidence that *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR is not sexually transmitted. *J Infect Dis* 1989;160:328-31.
- ⁹⁸. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR pneumoniae. *Ann Rev Med* 1992;443:317-23.
- ⁹⁹. Leinonen M. Pathogenic mechanism and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Heart J* 1993;14SK:57-61.
- ¹⁰⁰. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. *Chest* 1989;95:664-9.
- ¹⁰¹. Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkäniemi J, Naukkarinen A, Saikku P. Importance of smoking for *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Int J Epidemiol* 1994;23:1315-21.

-
- ¹⁰². Forsey T, Darougar S, Treharne JD. Prevalence in human beings of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1986;26:763-7.
- ¹⁰³. Cook PJ, Honeybourne D. *Chlamydia pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1994;34:859-73.
- ¹⁰⁴. Wang JH, Liu YC, Cheng DL, Yeng MY, Chen YS, Chen BC. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in Taiwan. Scand J Infect Dis 1993;25:565-8.
- ¹⁰⁵. Freidank HM, Brauer D. Prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* TWAR in a group of German medical students. J Infect 1993;27:89-93.
- ¹⁰⁶. Montes M, Cilla G, Alcorta M, Pérez-Trallero E. High prevalence of *C. pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. Ped Infect dis J 1992;11:972-3.
- ¹⁰⁷. Kauppinen M, Saikku P, Kujala P, Herva E, Syrjala H. Clinical picture of community acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonía requiring hospital treatment: a comparison between chlamydial and pneumococcal pneumonía. Thorax 1996;51:185-9.
- ¹⁰⁸. Campbell LA, Barnes RC, Kozarsky PE, Spila JS. Culture-confirmed pneumonía due to *Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis 1991;164:411-3.
- ¹⁰⁹. Kern DG, Neill MA, Schachter J. A seroepidemiology study of *Chlamydia* Rhode Island. Evidence of serologic cross reactivity. Chest 1993;104:208-13.
- ¹¹⁰. Almirall J, Morato I, Riera F, Verdaguer A, Priu R, Coll P, y cols. Incidence of community-acquired pneumonía and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. Eur Respir J 1993;6:14-8.

-
- ¹¹¹. Blasi F, Cosentini R, Legnani D, Denti F, Allegra L. Incidence of community-acquired pneumonia caused by *Chlamydia pneumoniae* in Italian patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:696-9.
- ¹¹². Gómez J, Baños V, Ruiz J, Soto MC, Muñoz L, Nuñez ML, y cols. Propective study of epidemiology and prognostic factors in community acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:556-60.
- ¹¹³. Torres A, Dorca J, Zalacaín R, Bello S, El-Ebiary M, Molinos L, y cols. Community acquired pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease. Spanish multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1456-1461.
- ¹¹⁴. Sanchez J, Chiquero M, Bacaiocoa A, Crespo L, Costo A, Sapina A, y cols. Infección por *Chlamydia psittaci* y *C. pneumoniae* en Cáceres. *An Med Int* 1997;14:236-8.
- ¹¹⁵. Bartolome C, Mata M, Bernardez I. Importancia de *Chlamydia pneumoniae* como nuevo patógeno respiratorio. *Microbiología* 1996;12:51-4.
- ¹¹⁶. Antela A, Guerrero A, Meseguer M, Gonzalez J, Escudero P, Pérez MJ. Neumonías extrahospitalarias: estudio prospectivo de 101 pacientes adultos e inmunocompetentes durante un año. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11:525-30.
- ¹¹⁷. Pérez E, Picazo J. Aspectos epidemiológicos de *Chlamydia pneumoniae*. *Rev Esp Quimioterapia* 1999;12 Suppl 1:3-6.
- ¹¹⁸. Grayston JT, Mordhorst C, Bruu AL, Vene S, Wang SP. Country-wide epidemic of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR in Scandinavia, 1981-1983. *J Infect Dis* 1989;159:1111-1114.
- ¹¹⁹. Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkniemi J, Saikku P. The epidemic cycle of *Chlamydia pneumoniae* infection in eastern Finland, 1972-1987. *Epidemiol Infect* 1993;110:349-60.

-
- ¹²⁰. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst C, Saikku P, Thom D y cols. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. J Infect Dis 1990;161:618-25.
- ¹²¹. Marrie TJ, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC. Pneumonía associated with the TWAR strain of *Chlamydia*. Ann Intern Med 1987;106:507-11.
- ¹²². Grayston JT, Diwan VK, Cooney M, Wang SP. Community and hospital acquired pneumonía associated with *Chlamydia* TWAR infection demonstrated serologically. Arch Intern Med 1989;149:169-73.
- ¹²³. Stratton CW, Mitchell MW. The Pathogenesis of *Chlamydia* Infections. AIDEX 1996;15:83-90.
- ¹²⁴. Stratton CW, Mitchell MW. The Immunopathology of Chlamydial Infections. AIDEX 1997;16:89-94.
- ¹²⁵. Boman J, Soderberg S, Forsberg J, Birgander SL, Allard A, Persson K, y cols. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and in middle-aged blood donors. J Infect Dis 1998;178:274-7.
- ¹²⁶. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI: Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. Trends Microbiol 1994;2:94-8.
- ¹²⁷. Lindsquit S, Craig EA. The heat shock proteins. Ann Rev Genet 1988;22:631-77.
- ¹²⁸. Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HR Jr, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. J Rheumatol 1998;25:734-42.

-
129. Grayston JSH, Keane KOH, Jecock RM, Pearce JH. Identification of two *Chlamydia trachomatis* antigens recognized by synovial fluid T cells from patients with *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *J Rheumatol* 1996;23:130-6.
130. Kikuta LC, Poulakkainen M, Kuo CC, Campbell LA. Isolation and sequence analysis of *Chlamydia pneumoniae* Gro El operon. *Infect Immun* 1991;59:4665-4669.
131. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor R. Detection and widespread distribution *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Path* 1996;49:102-6.
132. Hahn DL. Intracellular pathogens and their role in asthma: *Chlamydia pneumoniae* in adult patients. *Eur Respir Rev* 1996;38:224-30.
133. Vignola AM, chanez P, Polla Bs, Vic P, Godard P. Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:683-91.
134. Matsumoto A, Manire GP. Electron microscopic observations of the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 1970;101:278-85.
135. GumpDW. Antimicrobial susceptibility testing for some atypical microorganism: *Chlamydiae*, *Mycoplasmas*, *Rickettsia*, and *Spirochetes*. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3rd edition. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 279-94.
136. Welsh LE, Gaydos CA, Quinn TC. In vitro evaluation of activities of azithromycin, erythromycin, and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:291-94.

-
- ¹³⁷. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, y cols. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. Clin Infect Dis 1992;14:178-82.
- ¹³⁸. Perez JA, Storz J. Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. Infect Human 1985;50:905.
- ¹³⁹. Grayston JT. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Clin Infect Dis 1992;15:757-63.
- ¹⁴⁰. Grayston JT, Aldous MB, Easton SP Wang, Kuo CC, Campbell LA y cols. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonía and bronchitis. J Infect Dis 1993; 168: 1231-35.
- ¹⁴¹. Porath A, Schlaeffer F, Lieberman D. The epidemiology of community-acquired pneumonía among hospitalized adults. J Infect 1997;34:41-8.
- ¹⁴². Leinonen M. Pathogenetic mechanisms and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. Eur Heart J 1993;14SK:57-61.
- ¹⁴³. Niki Y, Kishimoto T. Epidemiology of intracellular pathogens. Clin Microbiol Infect 1996; 1 Supp 1:S11-3.
- ¹⁴⁴. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R editores. Principles and practice of infectious diseases 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. p.1696-70.
- ¹⁴⁵. Multiple Sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae*. Neurology 1998; 50 (2): 571-572.

-
- ¹⁴⁶. Huovinen P, Lahtoner R, Ziegler T, Meurman O, Hakkarainen K, Miettinen A. Pharyngitis in adults: The presence and coexistence of viruses and bacterial organism. *An Int Med* 1989;110:612-16.
- ¹⁴⁷. Thom DH, Grayston JT, Wang SP, Kuo C, Altman J. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR, *Mycoplasma pneumoniae* and viral infections in acute respiratory disease in a university health clinic. *Am J Epidemiol* 1990;132:248-56.
- ¹⁴⁸. Augenbraun M, Roblin P, Mandel L, Hammerschlag M, Schachter J. *Chlamydia pneumoniae* with pleural effusion: diagnosis by culture. *Am J Med* 1991;91:437-38
- ¹⁴⁹. Dalhoff K, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. Clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest* 1996;110:351-56.
- ¹⁵⁰. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:675-85.
- ¹⁵¹. Clark R, Mashatt D, Fazal B. Case report. *Chlamydia pneumoniae* in an HIV-infected man. *Am J Med Sci* 1991;302:401-2.
- ¹⁵². Augenbraun MH, Roblin PM, Chirgwin K, Landman D, Hammerschlag MR. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the lungs of patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1991;29:401-2.
- ¹⁵³. Gaydos CA, Fowler V, Gill J, Eiden J, Quinn T. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in an immunocompromised population. *Clin Infect Dis* 1993;17:718-23.
- ¹⁵⁴. Blasi F, Cosentini R, Clerici Schoeller M, Lupo A, Allegra L. *Chlamydia pneumoniae* seroprevalence in immunocompetent and immunocompromised populations in Milan. *Thorax* 1993;48:1261-3.

-
155. Miller S, Hammerschlag M, Chirgwin K, Rao S, Roblin P, Cassel g. Role of *Chlamydia pneumoniae* in acute chest syndrome in sickle cell disease. J Pediatr 1991;161:30-3.
156. Hashigushi K, Ogawa H, Kazuyama Y. Seroprevalencie of *Chlamydia pneumoniae* infections in orolaryngeal diseases. J Laryngol Otol 1992;106:208-10.
157. Ogawa H, Fujisawa T, Kazuyama Y. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the middle ear aspirates of otitis media with effusion. Case report. J Infect Dis 1990;16:1000-1.
158. Hahn DL, Dodge RW, Golubjatnikow R. Association of *Chlamydia penumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asmathic bronchitis and adult-onset asthma. JAMA 1991;266:225-30.
159. Blasi G, Legnani D, Lombardo V, Negretto G, Magliano E, Pozzoli R, y cols. *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of COPD: Eur respir J 1993;6:19-22.
160. Hahn DL. *Chlamydia pneumoniae*, asthma, and COPD: what is the evidence? Ann Allergy Asthma Immunol 1999;83:271-2.
161. Emre U, Bernius M, Roblin PM, Gaerlan PF, Summersgill JT, Steiner P, y cols. *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with cystic fibrosis. Clin Infect Dis 1996;22:819-23.
162. Miyashita N, Yoshito N, Nakajima M, Kawane H, Matsushima T. *Chlamydia pneumoniae* infection in patiens with diffuse panbronchiolitis and COPD. Chest 1998;114:969-71.
163. Gronhagen C, Saikku P, Grayston JT. Antibodies to TWAR. A novel type of *Chlamydia* in sarcoidosis. En: Grassi C, Ryszato G, Pozzi E, editores. Sarcoidosis

and other granulomatous disorders. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1988. p.297-301.

- ¹⁶⁴. Thomas P, Hunninghake G. Current concepts of the pathogenesis in sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:747-60.
- ¹⁶⁵. Harris A, Pottage J, Kessler H, Zeihen M, Levin S. Psittacosis bacteremia in a patient with sarcoidosis. *Ann Intern Med* 1984;502-3.
- ¹⁶⁶. Crosse B, Gomes P, Muers M. Ovine psittacosis and sarcoidosis in a pregnant woman. *Thorax* 1991;46:604-6.
- ¹⁶⁷. Erntell M, Ljunggren K, Gadd T, Persson K. Erythema nodosum—a manifestation of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection. *Scand J Infect Dis* 1989;21:693-6.
- ¹⁶⁸. Freyden A, Kihlström E, Maller R, Persson K, Romanus V, Ansehn S. Clinical and epidemiological study of “ornithosis” caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *Scand J Infect Dis* 1980;21:681-91.
- ¹⁶⁹. Haidel S, Ivarsson S, Bjerre I, Persson K. Guillain-Barre syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. *N Engl J Med* 1992;326:576-577.
- ¹⁷⁰. Braun J, Laitko S, Treharne J, Eggens U, Wu P, Distler A y cols. *Chlamydia pneumoniae*—a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:100-5.
- ¹⁷¹. Sundelof B, Gnarpe H, Gnarpe J. An unusual manifestation of *Chlamydia pneumoniae* infection: meningitis, hepatitis, iritis and atypical erythema nodosum. *Scand J Infect Dis* 1993;25:259-61.
- ¹⁷². Coutts WE. Lymphogranuloma venereum, general review. *Bull WHO* 1950;2:545-62.

-
- ¹⁷³. Frick M, Elo O, Haapa K, Heinonen O, Heinsalmi P, Helo P, y cols. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with genfibrozil in middle-aged men with dyslipemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317:1237-45.
- ¹⁷⁴. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman M, Nieminen M, Makela P. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia* TWAR, with chronic coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;2:983-6.
- ¹⁷⁵. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman M, Manninen V. Chronic *Chlamydia* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992;116:273-8.
- ¹⁷⁶. Blasi F, Cosentini R, Raccanelli R, Massari F, Arosio C, Tarsia P, Allegra L. A possible association of *Chlamydia pneumoniae* infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age. *Chest* 1997;112:309-12.
- ¹⁷⁷ Thom DH, Wang SP, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11:547-51.
- ¹⁷⁸. Vidal E. *Chlamydia pneumoniae* y arteriosclerosis: ¿Espectadora inocente?. *An Med Interna* 1999;16:329-32.
- ¹⁷⁹ Toss H, Gnarpe J, Gnarpe H, Siegbahn A, Lindahl B, Wallentin L. Increased fibrinogen levels are associated with persistent *Chlamydia pneumoniae* infection in unstable coronary disease. *Eur heart J* 1998;19:570-7.
- ¹⁸⁰. Leinonen M. Pathogenetic mechanism and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl K:57-61.

-
- ¹⁸¹. Kuo C, Shor A, Campbell L, Fikushi H, Patto D, Grayston J. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993;167:841-9.
- ¹⁸². Ramírez U, and the *Chlamydia pneumoniae* /Atherosclerotic Study Group. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1996;125:979-82.
- ¹⁸³. Kuo C, Gown A, benditt e, Grayston J. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1501-14.
- ¹⁸⁴. Grayston J, Kuo C, Coulson A, Campbell L, Lawrence R, Lee M, y cols. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995;92:3397-3400.
- ¹⁸⁵. Ramirez JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1996;125:979-82.
- ¹⁸⁶. Moazed TC, Kuo C, Grayston JT. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* 1997;174:883-90.
- ¹⁸⁷. Fong IW, Chiu B, Viira E. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1997;35:48-52.
- ¹⁸⁸. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Zhou X, Wong Y, Ward ME. *Chlamydia pneumoniae* infection and mortality from ischaemic heart disease: large prospective study. *BMJ*;321:204-207.
- ¹⁸⁹. Danesh J, Whicup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, y cols. *Chlamydia pneumoniae* IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ*;321:208-212.

-
- ¹⁹⁰. West R. Commentary: Adjustment for potential confounders may have been taken too far. *BMJ*;321:213.
- ¹⁹¹. Marrie TJ, Harczy M, Mann O, Landymor R, Raza A, Wang S. Culture negative endocarditis probably due to *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect dis* 1990;161:127-9.
- ¹⁹². Grant J, Hjetland R, Andreassen A. Pneuomía, myocarditis and reactive arthritis due to *Chlamydia penumoniae*. *Scand J Rheumatol* 1993;22:43-44.
- ¹⁹³. Odeh M, Oliven A. *Chlamydial* infections of the heart. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:885-93.
- ¹⁹⁴. Ruiz G, Cobos J, Fuentes F, Prieto J. *Chlamydia penumoniae*. Fundamentos de su diagnóstico y terapéutica. *Rev Esp Quimioterapia* 1998;11 Suppl. 1:5-13
- ¹⁹⁵. Komaroff A, Wang S, Lee J, Grayston J. No association of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection with chronic fatigue syndrome. *J Infect Dis* 1992;165:184-7.
- ¹⁹⁶. Cles LD, Stamm WE. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990;28:938-40.
- ¹⁹⁷. Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR. Use of Hep-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia penumoniae*. *J Clin Microbiol* 1992;30:1968-71.
- ¹⁹⁸. Hammerschlag MR. Diagnostic methods for intracellular pathogens. *Clin Microbiol Infect* 1996;1 Supl 1:3-8.
- ¹⁹⁹. Montalban GS, Roblin PK, Hammerschlag MR. Performance of three commercially available monoclonal reagents for confirmation of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. *J Clin Microbiol* 1994;32:1406-7.

-
- ²⁰⁰. Blasi F. Diagnosis of asthma: Laboratory procedures for identifying respiratory pathogens. *Eur Respir Rev* 1996;38:235-9.
- ²⁰¹. Falck G, Engstrand I, Gad A, Gnarpe J, Gnarpe H, Laurila A. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in patients with chronic pharyngitis. *Scand J Infect Dis* 1997;29:585-9.
- ²⁰². Campbell LA, Pérez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:434-9.
- ²⁰³. Gaydos A, Roblin PM, Hammerschlag MR, Hyman CL, Eiden JJ, Schachter J y cols. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 1994;323:903-5.
- ²⁰⁴. Black CM, Fields PI, Messner TO, Bernal BP. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested primers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:752-6.
- ²⁰⁵. Gnarpe J, Eriksson K. Sample preparation for *Chlamydia pneumoniae* PCR. *APMIS* 1995;103:307-8.
- ²⁰⁶. Prück PM, Aspöck C, Makristathis A, Rotter ML, Wang H, Willinger B y cols. Polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia pneumoniae* in gargled-water specimens of children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:141-4.
- ²⁰⁷. Gaydos CA, Eiden JJ, Oldach D, Mundy LM, Auwaerter P, Warner ML, y cols. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 1994;19:157-60.

-
208. Tong CY, Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. J Clin Pathol 1993;46:313-17.
209. Hyman CL, Augenbraun MH, Roblin PM, Schachter J, Hammerschlag MR. Asymptomatic respiratory tract infection with *Chlamydia pneumoniae* TWAR. J Clin Microbiol 1991;29:2082-3.
210. Khan MA, Potter CW, Sharrard RM. A reverse transcriptase-PCR based assay for in vitro antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1996;37:677-85.
211. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atheroma specimens. J Infect Dis 1996;174:893-6.
212. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodriguez DI, Lee A, Grayston JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimens. J Infect Dis 1997;176:292-5.
213. Schachter J: *Chlamydiae*. En: Rose NR, de Maccario EC, Fhey JL, Friedman H, Renn GM, editores: Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992. p. 661-6.
214. Wang SP, Grayston JT: Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluoresced test. Am J Ophthalmol 1970;70:367-74.
215. Verkooyen RP, Willmse D, Hiep-van Casteren CA, Mousavi SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, y cols. Evaluation of PCR, Culture, and Serology for Diangnosis of *Chlamydia pneumoniae* Respiratory Infections. J Clin Microbiol 1998 Aug;2301-7.

-
216. Eikman MR, Leinonen M, Sirjälä H, Linnanmäki e, Kujala P, Saikku P. Evaluation of serological methods en the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia during an epidemic in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:756-760.
217. Linnanmäki E, Leinonen M, Mattila K., Nieminen MS, Valtonen V, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae*-Specific circulating immunocomplexes in patients with chronic coronary heart disease. Circulation 1993;87:1130-4.
218. Saikku P. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infections. En: Allegra L, Blasi F, editors. *Chlamydia pneumoniae* infections. Milán: Springer-Verlag; 1995. p.51-64.
219. Verkooyen RP, Hazenberg MA, Van Haasen GH, Van den Bosch JM, Snidjder RJ, Van Helden HP, y cols. Age-related interferences with *Chlamydia pneumoniae* microoinmunofluorescence serology due to circulating rheumatoid factor. J Clin Microbiol 1992;30:1289-90.
220. Falck G, Gnarpe J, Gnarpe H. Persistent *Chlamydia pneumoniae* (TWAR): a common agente in a Swedish familiy. Scand J Infect Dis 1996;28;271-3.
221. Verkooyen RP, Van Lent NA, Mousavi SA, Snijder RJ, Van Den Bosch JM, Van Helden HP, y cols. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection in chronic obstructive pulmonary disease patients by using microimmunofluorescence and ELISA. J Med Microbiol 1997;56:959-65.
222. Schacter J. *Chlamydiae*. En: Rose NR, De Macario EC, Fahey JL, Friedeman H, Penn GM, editores. Manual of Clinical Immunology. 4th ed. Washington, DC: ASM press;1992. p.661-6.
223. Fraiz J, Jones RB. Chlamydial infections. Annu Rev Med 1988;39:357-70.
224. Tomasi TB, Grey HM. Structure and function of immunoglobulin A. Prog Allergy 1972;6:81-113.

-
225. Paltiel O, Kark JD, Leinonen M, Saikku P. High prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*: determinants of IgG and IgA seropositivity among Jerusalem residents. *Epidemiol Infect* 1995;114:465-73.
226. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Rev Méd Interne* 1996;17:45-7.
227. Gadea I, Soriano F. Sistemas de estudio de la actividad de antimicrobianos frente a Clamideas, Rickettsias y Micoplasmas. En Casal M, editor. Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos. Córdoba:Universidad de Córdoba; 1995. p.279-300.
228. Hammerschlag MR. Antimicrobial susceptibility and therapy of infections caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1994;38:1873-8.
229. Gnarpe J, Eriksson K, Gnarpe H. In vitro activities of azithromycin and doxycycline against 15 isolates of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1996;40:1843-5.
230. Kuo CC, Jackson LA, Lee A, Grayston JT. In vitro activities of azithromycin, clarithromycin and other antibiotics against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1996;40:2669-70.
231. Rodvold KA, Piscitelli SC. New oral macrolide and fluorquinolone antibiotics: an overview of pharmacokinetics, interactions and safety. *Clin infect dis* 1993;17:192-9.
232. Langtry HD, Brogden RN. Clarithromycin. A review of its efficacy in the treatment of respiratory tract infections in immunocompetent patients. *Drugs* 1997;53:973-1004.

-
- ²³³. Dunn CJ, Barradell LB. Azithromycin. A review of its pharmacological properties and use as 3-day therapy in respiratory tract infections. *Drugs* 1996;51:483-505.
- ²³⁴. Ortqvist A, Valtonen M, cars O, Wahl M, Saikku P, Jean C. Oral empiric treatment of community-acquired pneumoniae. A multicenter, double-blind, randomized study comparing sparfloxacin with roxithromycin. The scandinavian Sparfloxacin Study Group. *Chest* 1996;110:1499-506.
- ²³⁵. Lipsky BA, Tack KJ, Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. Ofloxacin treatment of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) lower respiratory tract infections. *Am J Med* 1990;89:722-4.
- ²³⁶. Labro MT. Intracellular bioactivity of macrolides. *Clin Microb Infect* 1996;1 Sppl 1:24-30.
- ²³⁷. Cooper MA, Baldwin D, Matthews Rs, Andrews JM, Wise R. In vitro susceptibility of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) to seven antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1991;28:407-13.
- ²³⁸. Hjelm E, Hulten K, Nystrom C, Gustafsson I, Engstrand L, Cars O. Assay of antibiotic susceptibility of *Chlamydia pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 1997;104 Suppl 1:113-4.
- ²³⁹. Malinverni R, Kuo CC, Campbell LA, Lee A, Grayston Jt. Effects of two antibiotics regimens on course and persistence of experimental *Chlamydia pneumoniae* TWAR pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:45-9.
- ²⁴⁰. Kaplan MA, Goldin M. The use of triacetyloleandomycin in chronic infectious asthma. En: Welch IL, Marti-Ibauez F, editores. *Antibiotic Annual, 1958-1959*. New York: Interscience Publishers;1959. p. 273-6.

-
- ²⁴¹. Black PN. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur Respir J* 1997;10:971-2.
- ²⁴². Koh YY, Lee MH, Sun Y, Seoung GW, Chae JH. Effect of roxithromycin on airway responsiveness in children with bronchiectasis: A double-blind, placebo controlled study. *Eur Respir J* 1997;10:994-9.
- ²⁴³. Kadota J. Non-antibiotic effect of antibiotics. *Clin Microbiol Infect* 1996;1 Suppl 2:20-2.
- ²⁴⁴. Black PN. The use of macrolides in the treatment of asthma. *Eur Respir Rev* 1996;6:240-3.
- ²⁴⁵. Morkawa K, Watabe H, Araake M, Morikawa s. Modulatory effect of antibiotics on production by human monocytes in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1366-70.
- ²⁴⁶. Peña M, Rubio M. ¿Se pueden o se deben tratar las reagudizaciones del asma con macrólidos?. *Rev Esp Quimioter* 1999 Jun;12:99-103.
- ²⁴⁷ Gupta S, Leatham EW, carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm J. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:404-7.
- ²⁴⁸ Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. ROXIS Study Group. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. *Lancet* 1997;350:404-7.
- ²⁴⁹. Carrasco JL. *Bioestadística básica*. 1ª ed. Madrid: CIBEST, S.L; 1991.

-
250. Métodos estadísticos en epidemiología. En: P. Armitage, Berry G, editores. Estadística para la investigación biomédica. 3^a ed. Madrid: Harcourt Brace; 1997. p. 480-506.
251. Von Hertzen L, Toyryla M, Gimishanov A, Bloigu A, Leinonen M, Saikku P, y cols. Asthma, atopy, and *Chlamydia pneumoniae* antibodies in adults. Clin Exp Allergy 1999;29:522-8.
252. Mills G, Lindeman J, Fawucett J, Gerbison G, Sears M. Chlamydia pneumoniae serological status is no associated with asthma in children or young adults. International J Epidemiol 2000;29:280-4.
253. Black PN, Scicchitano R, Jenkins CR, Blasi F, Allegra L, Wlodarczyk J, y cols. Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. Eur Respir J 2000;15:254-9.
254. Routes JM, Nelson HS, Noda JA, Simo FT. Lack of correlation between *Chlamydia pneumoniae* antibody titers and adult onset asthma. J Allergy Clin Immunol 2000;105:391-2.
255. Hahn DL, Peeling RW, Dillon E, McDonald R, Saikku P. Serologic markers for *Chlamydia pneumoniae* in asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 2000;84:227-33.
256. Frydén A, Kihlström E, Maller R, Persson K, Romanus V, Anséhn S. A clinical and epidemiological study of “ornitosis” caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). Scand J Infect Dis 1989;21:681-91.
257. Hahn DL, Golubjatnikov R. Asthma and Chlamydial infections: A case series. J Fam Pract 1994; 38:589-95.
258. Thom D. Lower respiratory tract infection with *Chlamydia pneumoniae*. Arch Fam Med 1994;3:828-32.

-
- ²⁵⁹. Aldous MB, West S, Kimaro DN, Wang S, Grayston JT, Kuo C. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infection in Tanzanian children. Trop Doctor 1996;26:18-9.
- ²⁶⁰. Björnsson E, Hjelem E, Janson C, Fridell E, Boman G. Serology of *Chlamydia* in relation to asthma and bronchial hyperresponsiveness. Scand J Infect Dis 1996 28;63:63-9.
- ²⁶¹. Biscione GL, Xie P, Johnson A. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* (CP) in children admitted to hospital with acute respiratory illness using PCR. Eur Respir J 1998;47:667-73.
- ²⁶². Teichtahl H, Buckmaster N, Pertnikovs E. The incidence of respiratory tract infections in adults requiring hospitalization for asthma. Chest 1997;112:591-6.
- ²⁶³. Emre U, Sokolovskaya N, Roblin P, Schacter J, Hammerschlag M. Detection of *Chlamydia pneumoniae*-IgE in children with reactive disease. J Infect Dis 1995;172:265-7.
- ²⁶⁴. Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM. Serum IgA antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1990;65:259-263.
- ²⁶⁵. Granfors K, Toivanen A. IgA-antiyersinia antibodies in yersinia triggered reactive arthritis. Ann Rheum Dis 1986;45:561-565.
- ²⁶⁶. Von Hertzen L, Leinonen M, Surcel HM, Kajalainen J, Saikku P. Measurement of sputum antibodies in the diagnosis of acute and chronic respiratory infections associated with *Chlamydia pneumoniae*. Clin Diagn Lab Immunol 1995;2:454-7.
- ²⁶⁷. Falck G, Heyman L, Gnarpe J. *Chlamydia pneumoniae* and chronic pharyngitis. Scand J Infect Dis 1995;27:179-182.

-
268. Sherman B, Jesberger B, Hahn DL. Chronic infection and asthma. *J Fam Pract* 1996;42:529-530.
269. Samra Z, Soffer Y. IgA anti*Chlamydia* antibodies as a diagnostic tool for monitoring of active chlamydial infection. *Eur J Epidemiol* 1992;8:882-4.
270. Cunningham AF, Johnston SL, Julious SA, Lampe FC, Ward ME. Chronic *Chlamydia pneumoniae* and asthma exacerbations in children. *Eur Respir J* 1998;11:345-9.
271. Hogg JC. Persistent and latent viral infections in the pathology of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:2-3.
272. Hahn DL, Anttila T, Saikku P. Association of *Chlamydia pneumoniae* IgA antibodies with recently symptomatic asthma. *Epidemiol Infect* 1996;117:513-7.
273. Kimura M. Experimental study on the mechanisms of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infection in mice with former Chlamydial exposure. *J Jpn Assoc Infect Dis* 1994;68:50-8.
274. Hyman CL, Roblin PM, Gaydos C, Quinn TC, Schchter J, Hammerschlag MR. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis* 1995;20:1174-8.
275. Cunningham A, Johnston S, Julious S, Sillis M, Ward MD. The role of *Chlamydia pneumoniae* and other pathogens in acute episodes of asthma in children. *Eur Respir J* 1998;11:345-9.
276. Cook PJ, Davies P, Tunnicliffe, Ayres JG, Honeybourne D, Wise R. *Chlamydia pneumoniae* and asthma. *Thorax* 1998;53:254-29.
277. Hahn DL. Infection as a cause of asthma [carta]. *Ann Allergy* 1994;73:276.

-
278. Kawane H. *Chlamydia pneumoniae* [carta]. Thorax 1993;48:871.
279. Hahn DL, Bukstein D, Luskin A, Zeitz H. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection in steroid-dependent asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 1998; 80:45-9.
280. Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H. *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections. Acta Pædiatr 1998;87:23-27.
281. Jenkins C, Blasi F, Allegra L, Black P, Hopkins S. *Chlamydia pneumoniae* Asthma Roxithromycin Multinacional (CARM): Seroprevalence results. Fourth International Conference on the Macrolides, Azalides, Streptogramins and Ketolides. Barcelona, España 1998; Abst. 4.22.
282. Vincente F, Petitjean J, Fillmont JE, Le Moel G, Fontaine V, Vabret A y cols. Acute respiratory *Chlamydia pneumoniae* infections in adults. Value of direct gene amplification diagnosis. Rev Mal Respir 1999 Dec;16:1131-7.
283. Yamazaki T, Nakada H, Sakurai N, Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* in young children in Japanese family. J Infect Dis 1990;162:1390-2.
284. Hagiwara K, Tashiro N, Ouchi K. Outbreak of *Chlamydia pneumoniae* infection in a junior high school (its symptomatology and detection of *C. pneumoniae* by PCR) (Abstract K40). Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco, California: American Society for Microbiology; 1995. p.249.
285. Saikku P, Ruutu P, Leinonen M, Panelius J, Tupasi TE, Grayston JT. Acute lower-respiratory-tract infection associated with chlamydial TWAR antibody in Filipino children. J Infect Dis 1988;158:1095-7.

-
286. Kutlin A, Roblin PM, Hammerschlag MR. Antibody response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children with respiratory illness. *J Infect Dis* 1998;177:720-4.
287. Harris JS, Kolocathis A, Campbell M. Safety and efficacy of azithromycin in treatment of community-acquired pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:865-71.
288. Katzman DK, Tipton AC, Litt IF, Friedman IM, Emmons RW, Schachter J. The incidence of *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory tract infections among university students in northern California. *West J Med* 1991;155:136-9.
289. Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* infections. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:260-1.
290. Hahn DL, Emre U, Hammerschlag M. Anti-*Chlamydial* antimicrobial therapy for asthma. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995;149:219-20.
291. Weiss S, Quist J, Roblin P. The relationship between *Chlamydia pneumoniae* and bronchospasm in adults (Abstract K 39). Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, California: American Society for Microbiology; 1995. p 294.
292. Larsen FO, Norn S, Mordhorst CH, Stahl P, Milman N, Clementsen P. *Chlamydia pneumoniae* and possible relationship to asthma. Serum immunoglobulins and histamine release in patients and controls. *APMIS* 1998;106:928-34.
293. Blasi F, Consentini R, Dal Negro R. *Chlamydia pneumoniae* infection in adult asthmatic patients [Abstract]. *Eur Resp J* 1998;12:47s.