

G. NAPPI
S. DE LUCA
M. GUINZONI CONFORTINI
F. STRINATI
M.M. MASCIOCCHI

Effetti a breve termine della crenoterapia inalatoria con acqua di Tabiano sulla produzione di anticorpi di *Chlamydia pneumoniae* in soggetti affetti da BPCO

Short term effects of inhalation with sulphurous water on *Chlamydia Pneumoniae* bodies production in patients affected by COPD

Parole chiave:

***Chlamydia pneumoniae*
BPCO
Crenoterapia solfurea**

Key Words:

***Chlamydia pneumoniae*
COPD
Sulphurous Spa Therapy**

RIASSUNTO

Chlamydia pneumoniae, per lo spiccato tropismo nei confronti dell'epitelio delle vie respiratorie, è implicata nella progressione e nelle riacutizzazioni di BPCO.

La sperimentazione condotta con crenoterapia inalatoria solfurea si qualifica come presidio efficace in quanto in grado di ridurre i tassi anticorpali IgA ed IgG.

Il trattamento crenoterapico trova, di conseguenza, una collocazione razionalmente giustificata.

SUMMARY

Chlamydia pneumoniae is one of the most important germ involved in relapses of COPD.

This study showed effective results on reduction of IgA and IgG immunoglobulins. Consequently we can say that this treatment is rationally justified.

Chlamydia pneumoniae (1), insieme a *Chlamydia psittaci* e *trachomatis*, forma il genere a sé stante delle *Chlamydie*, microorganismi che vengono considerati una particolare varietà di batteri.

È un patogeno intracellulare obbligato di piccole dimensioni, con caratteristiche analoghe ai gram-positivi. Attualmente è ritenuto responsabile di infezioni dei tratti respiratori superiore ed inferiore quali sinusiti, faringiti, bronchiti e polmoniti (1); occasionalmente di otiti, meningoencefaliti ed endocarditi (7, 8, 9).

Recenti studi hanno riconosciuto *Chlamydia pneumoniae* come il

più comune patogeno intracellulare non virale, con ruolo anche in malattie croniche di varia natura (es. sarcoidosi) (1, 2, 6), mentre è controversa la sua associazione con l'asma (2, 3).

Il batterio può essere presente in forme aberranti non replicative ma persistenti ed antigenicamente attive all'interno delle cellule ospiti; occasionalmente anche tali forme andrebbero incontro a lisi e rilascio extracellulare (2).

Lo spiccato tropismo per l'epitelio respiratorio, promosso da caratteristiche di adesività selettiva (4), si accoppia alla fre-

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Cattedra di Terapia Medica e Medicina Termale
Scuola di Specializzazione in Idrologia Medica
Centro Studi e Ricerche in Medicina Termale

Direttore: Prof. G. Nappi

quente asintomaticità dell'infezione (3, 5).

La sieroprevalenza di questo agente, valutata con studi epidemiologici, cresce con l'età ed è stimata al 40% nell'adulto occidentale, supera il 60% nell'anziano (10).

Nessuna età è risparmiata; in studi effettuati su popolazioni infantili la prevalenza è comunque minore (11, 12).

Nelle broncopatie croniche l'infezione da *Chlamydia pneumoniae* è relativamente frequente e sembra contribuire alla progressione della malattia. La persistenza del microorganismo sarebbe inoltre associata all'aumento di frequenza delle riacutizzazioni (2, 13).

Il meccanismo patogenetico di *Chlamydia pneumoniae* coinvolge la clearance mucociliare, alterata per inibizione dei movimenti ciliari (14). L'epitelio danneggiato produce inoltre fattori proinfiammatori quali l'IL1, IL6, IL8; si assiste alla produzione massiva di molecole di adesione ed alla riduzione di ossido nitrico (fattore ad azione broncodilatatrice) (2).

In pazienti affetti da BPCO in particolare, la prevalenza di infezione cronica da *Chlamydia pneumoniae* è valutata in base ad un gradiente di positività dei markers (anticorpi sierici, IgA secretorie, PCR su espettorato ed immunocomplessi circolan-

ti) varia dal 46% al 71% dei soggetti (15).

I dati epidemiologici sono confermati da tecniche di microscopia elettronica ed immunocitochimica.

Esiste correlazione tra la gravità della compromissione funzionale e l'infezione cronica da *Chlamydia pneumoniae* (16).

La persistenza del microorganismo nell'apparato respiratorio potrebbe favorire la penetrazione di altri patogeni nelle basse vie aeree ed il danno causato da *Chlamydia pneumoniae* accelererebbe direttamente il decadimento anatomico e funzionale nelle BPCO.

La cronicizzazione dell'infezione sarebbe sostenuta anche da una risposta di tipo Th2 con complesse interazioni con le difese immunitarie dell'ospite. Parteciperebbero al processo, con meccanismi sinergici: TNF- α , HSP60, MMP-9, NF- α kB, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, MCP3, COX-2 (16).

Diversi studi riguardano trattamenti mirati con antibiotici in pazienti con BPCO ed evidenza sierologica di infezione cronica da *Chlamydia pneumoniae*.

Tale infezione non mostra alcuna tendenza alla remissione spontanea (16).

La classe di antibiotici più indagata è quella dei macrolidi, cui il microorganismo è notoriamente sensibile; in particolare sono utilizzati eritromicina,

roxitromicina ed azitromicina (1, 3, 16).

È da ricordare l'azione antiinfiammatoria dei macrolidi, con meccanismi distinti dall'effetto antimicrobico (batteriostatico). Tale effetto antiflogistico può rendere problematica la valutazione dei parametri in esame ed invalidarne in parte il significato (2).

I risultati più convincenti in termini di efficacia sono stati documentati con utilizzo di azitromicina.

Un trattamento di 6 settimane, con dosi giornaliere di 500 mg di azitromicina per tre settimane, seguite da tre dosi settimanali di 1000 mg in somministrazione unica, hanno prodotto un'eradicazione del 67% dei trattati, sebbene a due mesi di distanza solo il 47% fosse libero dalla ricolonizzazione batterica.

Questi dati indicano la necessità di un trattamento prolungato e la necessità di ripeterlo durante le riacutizzazioni successive (16).

La considerazione evidente è che trattamenti prolungati con macrolidi espongono i pazienti – spesso anziani – al rischio epatolesivo (2).

Un trattamento crenoterapico che si rivelasse efficace troverebbe, di conseguenza, una collocazione razionalmente giustificata.

SIEROLOGIA DI *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*

La dimostrazione del ruolo causale di un dato fattore nella genesi di una malattia richiede che vengano soddisfatte tre condizioni:

- a) che quel fattore sia evidenziabile con elevata frequenza nei soggetti malati ma non nei soggetti sani;
- b) che nell'ambito dei soggetti malati esista una relazione tra intensità di presenza del fattore e severità della malattia;
- c) che l'abolizione del fattore (ad esempio con trattamento farmacologico) abbia un riscontro positivo sulla malattia.

Poiché la prevalenza di infezione da *Chlamydia pneumoniae* è molto alta, come evidenziato dal fatto che la maggioranza degli adulti presenta segni sierologici di un precedente in tal senso, spesso con decorso asintomatico, la prima delle tre condizioni non è soddisfatta, mentre per la seconda e la terza – in merito alle riacutizzazioni di BPCO – esiste sufficiente evidenza sperimentale.

Non possiamo quindi parlare di un fattore causale, ma concausale. La lesività di tale fattore appare comunque provata (3, 14, 15).

Un secondo ostacolo nasce dalla difficoltà di distinguere in maniera affidabile, sul solo reperto sierologico, tra infezio-

ne passata, recente e attuale. Ciò è dovuto principalmente alle ampie aree di sovrapposizione nei diagrammi di andamento nel tempo delle varie classi di immunoglobuline nei vari tipi di infezione (1, 3).

Da ultimo esiste la possibilità di reazioni sierologiche crociate tra le varie specie di *Chlamydia* (3).

muose che i radicali solfurei determinano sull'epitelio ghiandola respiratorio promuovono il movimento ciliare e la formazione del gel ricoprente (17, 18).

Le acque di Tabiano sono acque fredde, moderatamente ipotoniche, solfureo-salco-calco-magnesiache, con elevato grado solfidrometrico (19).

ACQUA DI TABIANO	SORGENTE PERGOLI	POZZO ARVÈ
Residuo fisso 180°C	2.748 mg/l	3.787 mg/l
Grado solfidrometrico	115 mg/l	155 mg/l
So ₄ ⁻⁻	1.440 mg/l	2.008 mg/l
HCO ₃ ⁻	530 mg/l	460 mg/l
Ca ⁺⁺	657 mg/l	670 mg/l
Mg ⁺⁺	63 mg/l	130 mg/l

CRENOTERAPIA INALATORIA CON ACQUA SOLFUREA

A livello dell'apparato respiratorio il contatto tra mucosa e mezzo termale, rappresentato in questo caso dall'acqua solfurea, produce effetti quali:

- vasodilatazione con azione trofica e promozione dello scambio transmucoso di molecole;
- stimolazione del SRE e dell'attività fagocitaria;
- aumento delle IgA secretorie nel muco;
- azione anticatarrale del gruppo sulfidrilico a livello della mucina;
- azione batteriostatica.

La regolazione delle secrezioni

Gli aerosol crenoterapici hanno parametri variabili in base alla metodica inalatoria.

Le particelle inferiori a 5 micron, tendono a conservare la propria individualità e a non fondersi tra loro, quindi a non sedimentare, grazie ai seguenti fattori:

- differenza di tensione superficiale tra fase dispersa (acqua solfurea in questo caso) e fase disperdente (aria);
- modesta forza di gravità cui sono sottoposte;
- carica elettrica dello stesso segno per la quasi totalità degli elementi.

Le particelle soggiacciono al movimento browniano che ne

favorisce la diffusione nelle vie aeree, mentre le piccole dimensioni assicurano un'ampia superficie libera di contatto con la mucosa respiratoria.

Il comportamento di un aerosol inalato e successivamente espirato dipende essenzialmente dalle caratteristiche delle particelle e da quelle del flusso.

CARATTERISTICHE DELLE PARTICELLE

Gli aerosol usati in crenoterapia sono composti da particelle di diverse dimensioni e vengono pertanto denominati eterodispersi (*fig. 1, parte superiore*).

Il parametro sintetico descrittivo più importante è la distribuzione granulometrica, che permette una raffigurazione delle caratteristiche dimensionali su base statistica, con una rappresentazione log-normale dei vari diametri delle particelle (*fig. 1, parte inferiore*).

A diverse metodiche inalatorie corrispondono diverse dimensioni e distribuzioni dei particolati ottenuti (*fig. 2 e 3*).

CARATTERISTICHE DEL FLUSSO

La cavità nasale e quella orale rappresentano due vie parallele che consentono di ridurre la resistenza al flusso aereo.

Nel passaggio attraverso le narici si raggiungono valori di flusso di 12-18 m/s cioè oltre 10 volte più elevati di quelli tracheali. A livello nasale inoltre la direzione del flusso cambia

sia in corrispondenza delle narici che del passaggio dal naso in rinofaringe, con restringimenti che facilitano la funzione di filtro; solo a livello del laringe il restringimento è di tale entità da provocare turbolenze di flusso, che diventa di tipo laminare alla quarta generazione bronchiale.

Le dimensioni delle particelle e la distribuzione dei flussi nelle vie aeree determinano in quale regione avverrà il deposito. In linea generale le particelle con diametro superiore ai 10 micron vengono intercettate nelle alte vie aeree, quelle tra 5 e 10 micron hanno una deposizione massima tra il faringe e la sesta diramazione bronchiale, quelle tra 1 e 5 micron si depositano progressivamente nelle diramazioni più periferiche mentre quelle con diametro inferiore al micron tendono ad essere riespirate.

Aerosol assunti per respirazione nasale (*fig. 4 superiore*) e per respirazione orale (*fig. 4 inferiore*) hanno quindi diversi profili di deposizione nei vari distretti delle vie respiratorie.

Altri fattori possono influire in modo indiretto sulle dinamiche del flusso.

Il pattern respiratorio, ad esempio, può favorire la deposizione periferica dell'aerosol con un incremento del volume inalato e della durata dell'apnea post-inspiratoria (19).

MATERIALI E METODI

In 2 periodi: 30/10/2001-22/12/2001 e 09/04/2002-20/07/2002, sono stati studiati soggetti, scelti casualmente tra coloro che hanno usufruito di un ciclo di terapia inalatoria termale di 12 inalazioni + 12 nebulizzazioni in ambiente presso la stazione termale di Tabiano con acqua del pozzo Arvè, per una durata di 2 settimane.

È stato effettuato uno screening spirometrico iniziale.

In caso di BPCO confermata dai valori strumentali (FEV1/SVC <88% del predetto nell'uomo e <89% del predetto nella donna) sono stati inseriti nello studio i soggetti con FEV1 di base maggiore od uguale al 50% del valore teorico. Sono stati esclusi i soggetti che hanno mostrato una reversibilità al test di broncodilatazione con β_2 -agonista selettivo (FEV1 aumentata >12% dopo inalazione di 400 mg di salbutamolo) ed inoltre:

- soggetti con modifica dell'abitudine tabagica nei 12 mesi precedenti l'arruolamento;
- soggetti con qualsiasi modifica della terapia in corso nei 15 giorni precedenti l'arruolamento;
- soggetti in terapia con tetracline fluorochinolonici o macrolidi nei 15 giorni precedenti l'arruolamento;
- pazienti affetti da gravi cardiopatie o da aritmie cardiache.

Sono stati così arruolati 37 soggetti (tab. 1).

All'inizio del ciclo di terapia, ottenuto il consenso informato, ai pazienti è stato richiesto un campione di espettorato ed un prelievo di sangue venoso periferico.

La procedura è stata ripetuta al termine del ciclo di terapia.

Per motivi logistici si è scelto di considerare il 1° giorno di terapia come giorno dell'arruolamento per i riferimenti anamnestici di esclusione e per i prelievi iniziali, ed il penultimo o ultimo giorno di terapia per i prelievi successivi.

Sono stati inclusi anche i prelievi effettuati con lieve anticipo o ritardo rispetto allo schema stabilito per salvaguardare la numerosità minima necessaria per la raccolta.

L'escreato è stato raccolto in contenitore sterile mediante espettorazione spontanea.

Di due probandi non è stato possibile ottenere campioni di espettorato ed altri due non si sono presentati al termine della cura.

Sui campioni di escreato sono state analizzate quantitativamente le IgA anti *Chlamydia pneumoniae*, sul siero ottenuto dal prelievo venoso periferico sono state dosate sia le IgA che le IgG.

A questo proposito la metodica ritenuta più attendibile e diffusamente accettata è la microimmunofluorescenza (20, 21).

Tabella 1. STATISTICHE DESCRITTIVE DEL CAMPIONE

	Numero soggetti	età media	DS età
MASCHI	25	59,6	6,9
FEMMINE	12	59,6	11,9
TOTALE	37	59,6	8,7

INTERVALLO MEDIO TRA I DUE PRELIEVI	9,6 giorni
DS	2,5 giorni

La recente disponibilità di un metodo immunoenzimatico E.L.I.S.A., accreditato di ottima sensibilità e specificità (22, 23), ne ha consentito l'adozione per questo studio [Eurospital® - sistema Eurospitalday]. È stata utilizzata la tetrametilbenzidina.

SCOPO DELLA RICERCA

In letteratura non esistono dati relativi ai livelli di IgA su escreato anti *Chlamydia pneumoniae* standardizzati. A questo proposito difficoltà legate a procedure di trattamento preanalitico dei campioni su escreato (rapporto di diluizione, composizione dei reagenti, ecc.) hanno finora impedito un raffronto significativo tra vari studi, poiché ogni elaborazione fa riferimento a difformi procedure di preparazione. Di conseguenza anche in fase analitica non è stato possibile identificare un cutoff standardizzato.

Esistono invece standard per quanto riguarda i valori su siero

di IgA ed IgG anti *Chlamydia pneumoniae*, per i quali è possibile identificare positivi e negativi. Nel presente studio si è deciso di considerare i valori analitici ottenuti sia su siero che su escreato in termini di densità ottica, e non come positivi o negativi, per poter valutare omogeneamente i risultati.

Alla luce di quanto esposto gli obiettivi di questo studio comprendono:

- la valutazione della possibile correlazione tra titolo anticorpale nell'espettorato e titolo sierico di IgA anti *Chlamydia pneumoniae*,
- la valutazione degli effetti a breve termine della terapia inalatoria termale con acqua solfurea sulle variazioni di titoli anticorpali sierici e su espettorato di IgA e IgG anti *Chlamydia pneumoniae*.

RISULTATI

La tabella 2 riporta i dati analitici ottenuti da ciascun campio-

ne esaminato, espressi come densità ottica, prima e dopo la cura (valori contrassegnati rispettivamente con "1°" e "2°"). Per ogni serie di campioni è riportata inoltre la numerosità dei medesimi, la media e la deviazione standard relativa.

La media dei 6 gruppi di dati è inoltre riportata nel *grafico 1*. Di seguito sono riportati i risultati del test "t" per dati appaiati per le serie di immunoglobuline su escreato e siero (33 classi di libertà per le IgA su escreato e 35 classi di libertà per le IgA

e IgG su siero).

CONCLUSIONI

L'esigua numerosità dei campioni considerati deve improntare ogni considerazione alla massima cautela. In quest'ottica sono diverse le indicazioni in merito allo scopo della ricerca. Rileviamo che in ciascuna delle tre serie di dati i valori dopo il trattamento crenoterapico delle immunoglobuline contro *Chlamydia pneumoniae* sono inferiori ai valori riscontrati prima della cura.

Ciò depone per una efficacia della crenoterapia nella modu-

lazione della risposta anticorpale verso *Chlamydia pneumoniae*, un effetto potenzialmente utile se confermato da un'estensione della ricerca a dati numericamente più consistenti. La mancanza di correlazione tra IgA sieriche e su escreato potrebbe essere effetto di una inadeguata procedura di preparazione preanalitica, una diversa dinamica nella risposta immunitaria dei due compartimenti biologici (locale e sistemico) o un intervallo insufficiente di tempo tra le rilevazioni.

TIPO DI IMMUNOGLOBULINE	t	P
IgA anti CP su escreato	1,885	<0,05
IgA anti CP su siero	3,785	<0,001
IgG anti CP su siero	3,561	<0,001

Di seguito è riportato il coefficiente di correlazione tra le IgA su escreato e le IgA su siero.

	COEFFICIENTE DI CORRELAZIONE
IgA su escreato 1°/2° campione	0,104
IgA su escreato/IgA su siero	0,027

Grafico 1. LIVELLI DI IMMUNOGLOBULINE PRIMA/DOPO CRENOTERAPIA INALATORIA (VALORI DI DENSITÀ OTTICA)

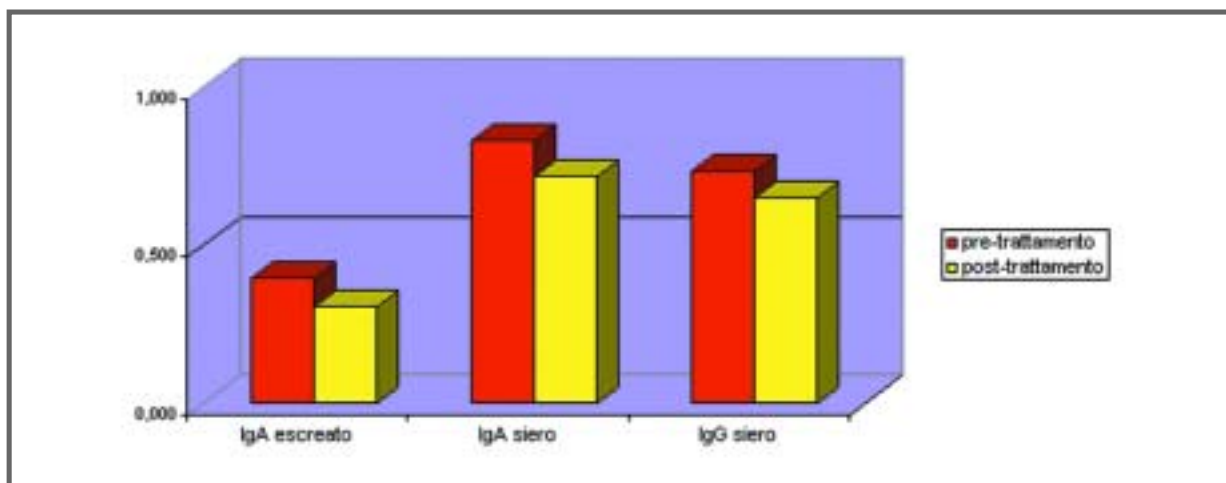
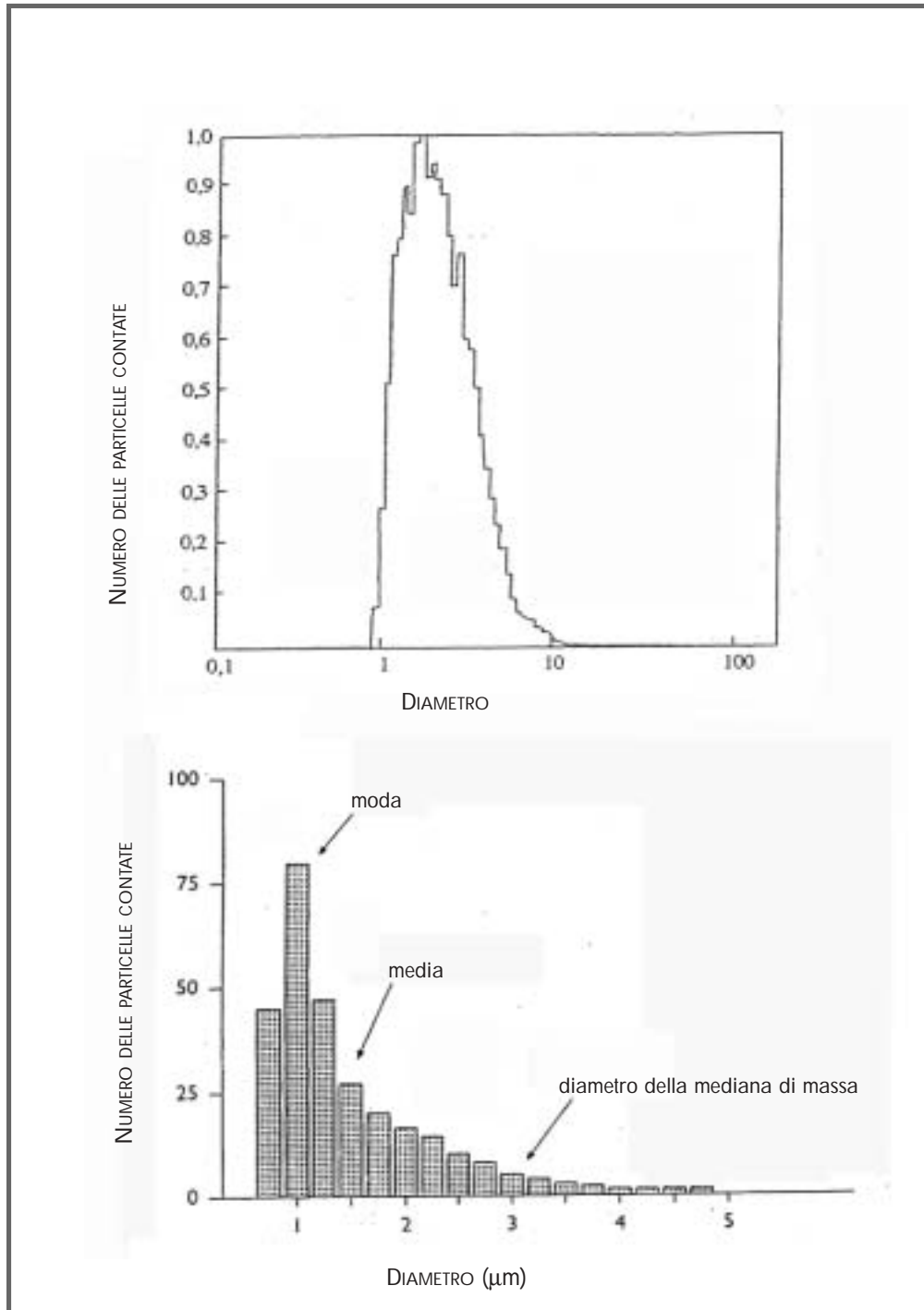


Tabella 2.

campione	IgA 1 escreato	IgA 2 escreato	IgA 1 siero	IgA 2 siero	IgG 1 siero	IgG 2 siero
1	1,036	0,262	0,936	0,811	1,253	1,114
2	0,278	0,239	1,279	1,188	0,971	0,796
3	0,169	0,147	0,693	0,618	1,419	1,356
4	0,410	0,303	1,305	1,151	1,181	0,941
5	0,252	0,220	0,671	0,638	0,903	0,827
6	0,494	0,168	0,578	0,459	0,600	0,497
7	0,132	0,142	0,226	0,252	0,269	0,276
8	0,180	0,339	0,968	0,784	1,036	0,858
9	0,940	0,218	1,295	1,093	0,213	0,212
10	0,236	0,211	0,572	0,529	0,155	0,153
11	0,155	0,179	0,690	0,681	1,428	1,439
12	0,191	0,119	0,543	0,506	0,787	0,633
13	0,872	0,341	0,639	0,566	0,399	0,112
14	0,195	0,264	2,696	2,253	1,086	0,917
15	0,170	0,152	0,558	0,560	0,197	0,201
16	ND	ND	0,228	0,189	0,168	0,176
17	0,512	0,296	1,023	0,960	1,469	1,401
18	ND	ND	0,241	0,195	0,163	0,157
19	0,187	0,649	0,298	0,357	0,659	0,695
20	0,287	0,292	0,368	0,341	0,184	0,151
21	0,219	0,239	1,074	0,866	1,169	1,010
22	0,299	0,240	0,736	0,765	0,537	0,506
23	0,342	0,255	0,355	0,287	0,358	0,310
24	0,508	0,387	1,344	1,345	1,152	1,135
25	0,375	0,316	0,781	0,778	0,942	0,760
26	0,340	0,298	0,666	0,666	0,490	0,492
27	0,924	0,290	0,240	0,207	0,218	0,175
28	0,803	0,345	0,328	0,367	0,394	0,400
29	0,315	0,559	0,454	0,406	0,635	0,483
30	0,444	ND	1,090	ND	1,294	ND
31	0,373	0,264	1,282	1,135	0,645	0,582
32	0,446	0,837	0,474	0,600	0,529	0,822
33	0,427	0,325	1,111	0,650	1,198	0,832
34	0,372	0,443	1,716	1,135	0,850	0,918
35	0,178	0,277	0,250	0,203	0,190	0,185
36	0,376	0,386	1,840	1,593	1,257	1,127
37	0,396	ND	1,208	ND	0,732	ND

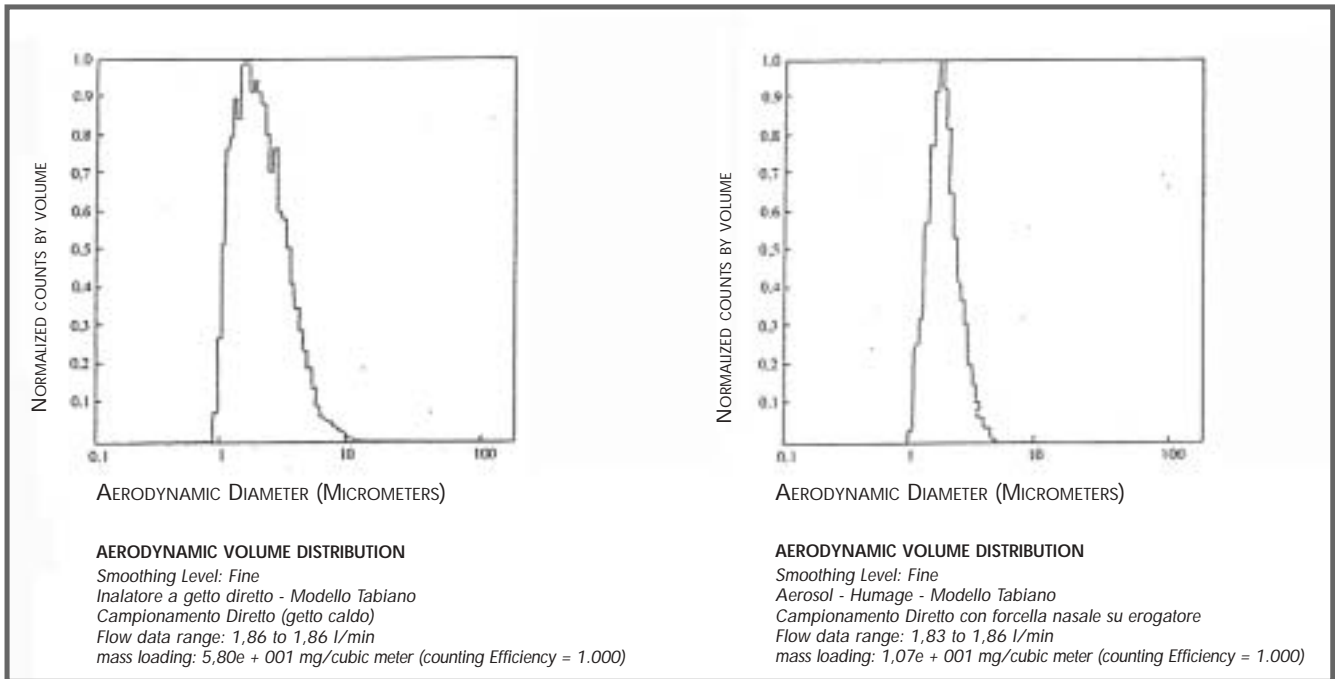
campioni	IgA 1 escreato	IgA 2 escreato	IgA 1 siero	IgA 2 siero	IgG 1 siero	IgG 2 siero
numerosità	35	33	37	35	37	35
media	0,395	0,303	0,832	0,718	0,733	0,647
DS	0,242	0,147	0,533	0,445	0,430	0,399

Figura 1



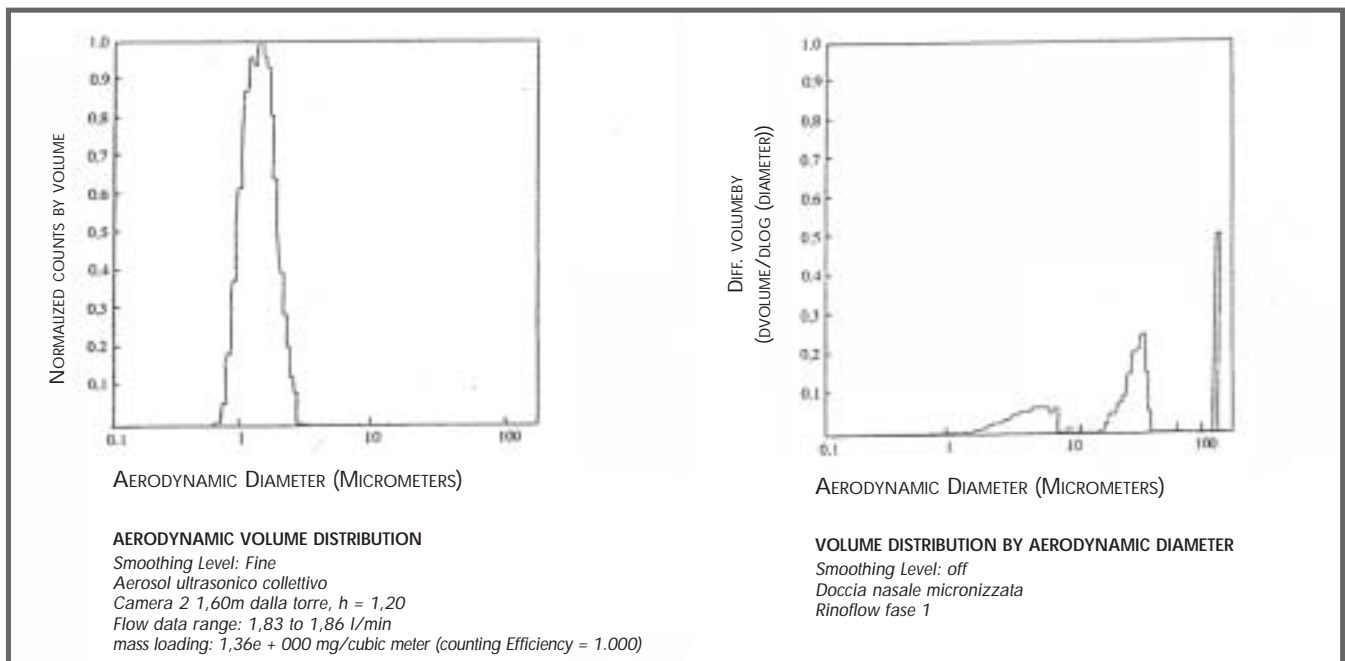
Da A.A.V.V. Tabiano e le sue cure II. *Tecniche idrotermali applicate alle acque. Sulphur, La Commerciale ed., Fidenza, 2001(1): 5-18.*

Figura 2



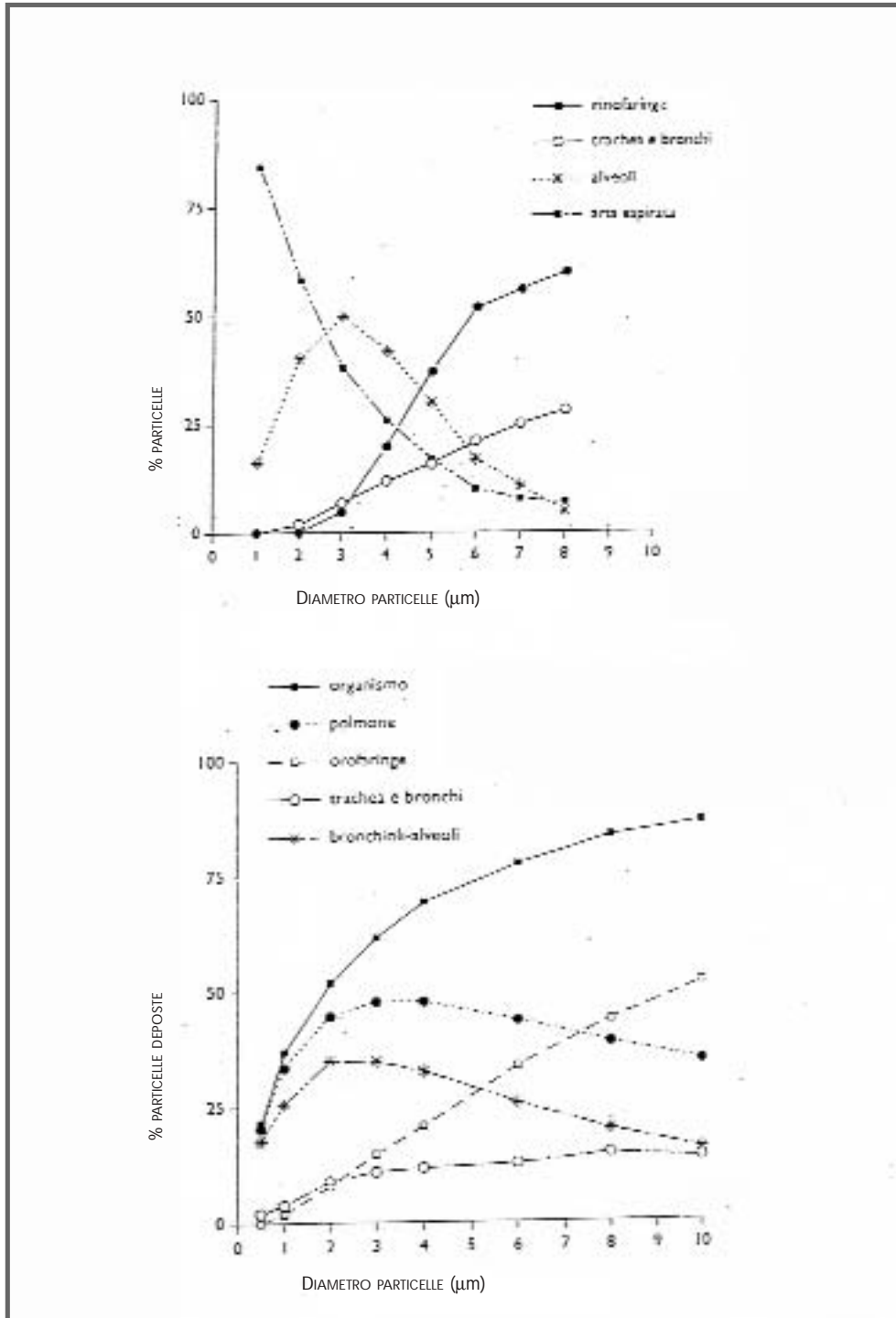
Da A.A.V.V. Tabiano e le sue cure II. *Tecniche idrotermali applicate alle acque. Sulphur, La Commerciale ed., Fidenza, 2001(1): 5-18.*

Figura 3



Da A.A.V.V. Tabiano e le sue cure II. *Tecniche idrotermali applicate alle acque. Sulphur, La Commerciale ed., Fidenza, 2001(1): 5-18.*

Figura 4



Da A.A.V.V. Tabiano e le sue cure II. *Tecniche idrotermali applicate alle acque. Sulphur*, La Commerciale ed., Fidenza, 2001(1): 5-18.

BIBLIOGRAFIA

1. Black P.N.: *Chlamydia pneumoniae* and asthma. Lessons from the CARM study. Lotta contro la TBC e mal. polm. soc. 1998, 68:251-253.
2. A.A.V.V. Consensus on respiratory diseases 1999, 6:289-308.
3. Black P.N. et al: trial of roxithromycin in subjects with asthma and sierological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae*. Am J Respir: Crit Care Med 2001, 164:536-541.
4. Grayson J.T. et al: *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. Chest 1989, 95(3):664-669.
5. Grayson J.T. et al: A new respiratory tractpathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J Infect Dis 1990, 161:618-625.
6. Poulakkainen M. et al: Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in patients with sarcoidosis. J Infect 1996, 33:199-205.
7. Ogawa H. et al: Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from middle ear aspirates of otitis media with effusion: a case report. J Infect Dis 1990, 162:1000-1001.
8. Socan M. et al: *Chlamydia pneumoniae* and meningoencephalitis. N Engl J Med 1994, 331:406.
9. Marrie T.J. et al: Culture negative endocarditis probably due to *Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis 1990, 161:127-129.
10. Blasi F. et al: *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of COPD. Eur Resp J 1993, 6:19-22.
11. Emre U. et al: The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airway disease in children. Arch Pediatr Adolesc Med 1994, 148:727-732.
12. Cunningham A.F. et al: Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. Eur Resp J 1998, 11:345-349.
13. Beaty C.D. et al: Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. Am Rev Respir Dis 1991, 144:1408.
14. Shemer-Avni Y. et al: *Chlamydia pneumoniae* induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. J Infect Dis 1995, 171:1274-1278.
15. Strachan D.P. et al: *Chlamydia pneumoniae* serology, lung function decline, and treatment for respiratory disease. Am J Respir: Crit Care Med 2000, 161:493-497.
16. Blasi F. et al: Valutazione della associazione tra infezione cronica da *Chlamydia pneumoniae* e ricorrenze infettive nel paziente con BPCO e trattamento con azitromicina. Clin It Mal Tor, 2001; 55:2.
17. Nappi G. et al: Influenze della crenoterapia sulla clearance mucociliare in pazienti affetti da sindrome rinosinusitica. Med Clin Term 2002, 49:305-313.
18. Nappi G.: Medicina e Clinica Termale. 2a ed., Selecta Medica, Pavia 2001.
19. A.A.V.V. Tabiano e le sue cure II. Tecniche idrotermali applicate alle acque. Sulphur, La Commerciale ed., Fidenza, 2001(1):5-18.
20. Kauppinen M. et al: Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae* prevalence clinical features: diagnosis and treatment. Clin Infect Dis 1995, 21(suppl 3):5244-5252.
21. Ni A.P. et al: A seroepidemiologic study of *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* in different populations on the mainland of China. Scand J Infect Dis.
22. Kishimoto T. et al: Assay of specific anti *Chlamydia pneumoniae* antibodies by ELISA method. Scand J Infect Dis.
23. Dereli D. et al: Chlamydial infections in infants. J Trop Pediatr 1996.