Pruebas de Provocación Bronquial con Ejercicio y con Histamina en Niños Asmáticos

Dr. Sergio Aguilar D.¹, Dra. Daisy Lewinson N.¹,
Dr. Rodrigo Moreno B.², Dra. Carmen Lisboa B.²

Exercise and Histamine challenges in children with asthma

Thirty one asthmatic children, 5 to 14 years old were studied, in order to compare exercise provocation test with histamine challenge for assessing airway's hyperreactivity in asthma. Both tests were performed randomly at 48 hours intervals. Exercise consisted in an out-door 8 minutes nonstop running. A 10% decrease in FEV₁ after exercise was considered positive. Histamine was administered by inhalation along two minutes during tidal breathing in twofold increasing concentrations. A 20% decrease in FEV₁ (Pc20) at histamine's concentrations of 8 mg/ml or higher was considered a normal response. There were no differences between FEV₁ preceeding each challenge. Ninety seven percent of the patients had positive histamine test compared with only 74% of positive exercise test. A significant correlation was found between histamine Pc20 and the percent fall in FEV₁ after exercise ($r = 0.404$ $p < 0.05$). Pc20 histamine correlated significantly with basal FEV₁: $r = 0.464$ ($P < 0.01$) but no correlation was found between basal and percent fall in FEV₁ after the exercise challenge. These results suggest that exercise is less sensitive than histamine challenge for screening airway's hyperreactivity in asthmatic children. (Key words: Asthma. Airway's hyperreactivity. Histamine provocation. Exercise provocation).

La respuesta broncoconstrictora exagerada de la vía aérea frente a diferentes estímulos inespecíficos constituye una de las características que definen el asma bronquial¹. Por este motivo se han desarrollado diversas pruebas de provocación bronquial, con fines diagnósticos y de investigación²⁻³⁻⁴. El ejercicio físico es el estímulo broncoconstrictor que se emplea más frecuentemente en el niño⁴⁻⁵. Sin embargo su aplicación clínica tiene limitaciones derivadas de su baja sensibilidad⁵⁻⁶⁻⁷ y de que la respuesta broncoconstrictora depende fundamentalmente de las condiciones de temperatura y humedad del aire ambiente inspirado⁸⁻¹⁰. Las pruebas de provocación bronquial con drogas broncoconstrictoras como histamina y metacolina, han sido, en cambio, utilizadas sólo ocasionalmente en el niño a pesar

que en el adulto han demostrado una buena sensibilidad y una caracterización muy objetiva de la hiperreactividad bronquial⁶⁻⁷⁻¹¹.

Este estudio se realizó con el propósito de comparar el rendimiento de las pruebas de provocación con ejercicio y con histamina en un grupo de niños con asma bronquial.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 31 niños con diagnóstico de asma bronquial, de acuerdo al criterio de la Sociedad Americana de Tórax¹, que estaban en control y tratamiento por alguno de los autores. 24 eran del sexo masculino y 7 del sexo femenino. La edad fluctuó entre 5 y 14 años con un promedio de $9,20 \pm 2,72$. Sus características antropométricas se resumen en la Tabla 1.

El estudio se realizó en dos sesiones separadas por 48 horas: en una se midió la respuesta al ejercicio y en la otra la respuesta a la inhalación a la histamina. Estas pruebas fueron hechas en

¹ Servicio de Pediatría Hospital Josefina Martínez.

² Departamento de Enfermedades Respiratorias. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

forma alternada, de modo que algunos niños iniciaron el estudio con ejercicio y otros con histamina.

El ejercicio consistió en una carrera al aire libre durante 8 minutos. La broncoconstricción se evaluó midiendo la caída del volumen espiratorio forzado del primer segundo (VEF_1), antes del ejercicio y 5, 10 y 15 minutos después de terminado éste. El VEF_1 fue medido en un espirómetro Collins de 9 litros y los valores observados en condiciones basales fueron expresados en porcentajes del valor teórico¹². En cada niño se realizaron por lo menos tres mediciones basales hasta asegurar una buena comprensión de la prueba. La magnitud del ejercicio realizado se valoró a través de la frecuencia cardíaca alcanzada al final de los 8 minutos.

La prueba de provocación con histamina se realizó utilizando una modificación del método, propuesta por Cockcroft y col.^{2,11}. El diluyente de la histamina y la solución de fosfato ácido de histamina se administraron por aerosol durante 2 minutos de respiración tranquila a través de la boca, utilizando un nebulizador de Hudson que, con un flujo de 5 litros por minuto, suministra 0,3 ml por minuto en partículas con una masa aerodinámica media de 2 μ m. El nebulizador unido a una mascarilla se aplicó a la cara del niño. La prueba se inició con el registro basal del VEF_1 , medido por lo menos tres veces una vez asegurada una buena comprensión de la prueba. Posteriormente se administró el diluyente de la his-

tamina por aerosol durante dos minutos y las determinaciones del VEF_1 , se hicieron al tercer minuto. El valor más bajo obtenido después del diluyente se utilizó como VEF_1 de referencia. Se excluyó del estudio aquellos niños en que el VEF_1 descendió más de 10% en relación al valor basal después de la inhalación del diluyente. Luego se administró el fosfato ácido de histamina comenzando con una concentración inicial de 0,06 mg/ml y midiendo nuevamente VEF_1 al tercer minuto de iniciada la nebulización. La dosis de histamina se aumentó progresivamente duplicando la concentración. La prueba se suspendió en la concentración inmediatamente superior a la que produjo 20% de caída del VEF_1 (Pc_{20}).

Con los datos de cada paciente se construyó una curva de dosis-respuesta en la que se puso VEF_1 en el eje vertical, expresado como porcentaje del valor obtenido con el diluyente y en el eje horizontal las concentraciones de histamina en escala logarítmica. En cada curva se calculó la Pc_{20} o dosis umbral, que es la concentración de histamina que produce 20% de la caída del VEF_1 . En la figura 1 se ilustra una curva de respuesta representativa en la que se indica la Pc_{20} .

En 22 de los niños ambas pruebas se realizaron con VEF_1 basal superior al 70%.

En 9 niños el VEF_1 fue superior a 70%: en 3, en la prueba de histamina, en 2 en la de ejercicio y en 4 en ambas pruebas (Tabla 1).

Figura 1.
Curva dosis respuesta a histamina obtenida en un paciente.
La línea vertical discontinua muestra la concentración que corresponde a la Pc_{20} .

Tabla I
Características de los niños estudiados

Caso	Sexo	Edad Años	Talla cm	Atopía Cutánea	Tratamiento	VEF ₁ H % teórico	VEF ₁ E % teórico	Frec. Cardíaca L x'
1	F	5	119	+	B.D. diario	69	73	180
2	M	5	112	—	B.D. diario	98	96	178
3	M	5	123	+	B.D. SOS	87	82	198
4	M	6	125	+	B.D. SOS	79	83	186
5	M	6	120	+	B.D. diario	72	80	176
6	M	7	128	+	B.D. SOS	75	82	196
7	M	7	125	+	B.D. diario	99	103	168
8	M	7	122	+	SOS	98	84	202
9	F	7	125	+	B.D. diario	71	91	198
10	M	7	134	+	B.D. diario	74	71	190
11	F	8	129	?	Sin	85	74	178
12	M	8	137	+	SOS	79	55	198
13	M	8	123	—	SOS	94	83	189
14	M	9	131	+	SOS	81	75	196
15	M	9	131	+	B.D. diario	72	72	177
16	M	9	125	—	Sin	97	86	187
17	M	10	150	+	B.D. diario	56	68	169
18	F	10	138	+	B.D. diario	81	78	188
19	F	10	141	?	Sin	67	72	176
20	M	11	136	+	SOS	66	71	186
21	F	11	142	+	SOS	99	97	166
22	M	11	140	+	B.D. diario Corticoides	66	53	198
23	M	11	135	—	Sin	87	103	198
24	F	11	137	—	B.D. diario	85	78	198
25	M	11	139	—	Sin	63	63	196
26	M	12	164	+	SOS	78	69	189
27	M	12	166	+	B.D. diario	103	88	172
28	M	13	149	+	B.D. diario	49	66	200
29	M	14	158	+	B.D. diario	90	97	172
30	M	14	159	+	SOS	90	79	168
31	M	14	159	?	Sin	84	86	152
<hr/>								
X		9,29	135,9			80,45	78,97	184,58
<hr/>								
DS ±		2,72	14,0			13,6	12,5	12,7

VEF₁H Volumen espiratorio del primer segundo previo a la prueba de histamina.

VEF₁E = VEF₁ previo a la prueba de ejercicio. B.D. Diarios Beta adrenérgicos o aminofilina diaria.

SOS Beta adrenérgicos o aminofilina ocasional.

Sin: Sin tratamiento.

En los días de estudio se suspendió la medicación antiastmática: 12 horas antes los derivados de teofilina y 8 horas, los betaadrenérgicos. No se suspendieron los corticoides.

Los padres y los niños fueron completamente informados y aceptaron participar en el estudio.

Como límite normal de dosis umbral de histamina se considera 8 mg/ml. Este valor es el correspondiente a adultos normales estudiados con el mismo método en nuestro laboratorio¹¹ y a los propuestos por Cockcroft y cols.². La prueba

de ejercicio fue calificada como positiva si la caída máxima del VEF₁ después del esfuerzo superaba el 10%⁴.

Los resultados se analizaron mediante pruebas de student para muestras pareadas y regresión lineal¹³.

RESULTADOS

En la figura 2 se ilustran los valores individua-

les de la Pc_{20} de histamina y del porcentaje de caída del VEF_1 post ejercicio observado en los pacientes. La línea horizontal limita el rango normal determinado en nuestro laboratorio utilizando el mismo método. Se puede observar que sólo un niño tuvo dosis umbral normal. El valor promedio fue de $1.37 \text{ mg/ml} \pm 1.8 \text{ D.S.}$ El promedio de caída de VEF_1 post ejercicio fue de $21.37\% \pm 17.32$. En 8 de los 31 niños el VEF_1 no cayó significativamente con el ejercicio.

Figura 2.

Valores individuales de Pc_{20} histamina (izquierda). Porcentaje de caída del VEF_1 post ejercicio (derecha). Cada punto corresponde a un paciente. La línea horizontal señala límites de normalidad.

En la Figura 3 se muestra la relación entre la máxima caída del VEF_1 post-ejercicio, en el eje horizontal, y la dosis umbral de histamina, en el eje vertical. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.408 ($p < 0.05$). Se observa que el niño que tenía Pc_{20} normal de histamina (8 mg/ml) tampoco se obstruyó con el ejercicio. En cambio 7 de los 8 niños que no se obstruyeron con el ejercicio tuvieron dosis umbral de histamina baja, entre 0.5 y 6.6 mg/ml.

Se encontró una relación significativa ($r = 0.464$ $p < 0.01$) entre el VEF_1 basal previo a la provocación con histamina y la Pc_{20} (Fig. 24). En cambio no hubo correlación entre el VEF_1 antes del esfuerzo y su caída con el ejercicio ($r = 0.161$ $p \text{ NS}$) (Fig. 5).

No encontramos diferencias significativas entre los valores de VEF_1 previos a histamina y a ejercicio.

No se observaron relaciones entre la magnitud

de la hiperreactividad a la histamina y al ejercicio, con medicación utilizada para controlar los síntomas de asma, ni con la edad de los niños.

Figura 3.

Relación entre Pc_{20} histamina (eje vertical) y VEF_1 previo a la prueba con histamina (eje horizontal).

Figura 4.

Relación entre Pc_{20} histamina (eje vertical) y VEF_1 post ejercicio (eje horizontal) (ver texto).

Figura 5.
Relación entre caída del VEF₁ post ejercicio
(eje vertical) y VEF₁ previo ejercicio
(eje horizontal).

DISCUSION

Estos resultados demuestran que la prueba de provocación bronquial con histamina es más sensible que la de ejercicio en el diagnóstico de asma en el niño, ya que 97% de los enfermos tuvo disminución de Pc_{20} con histamina y sólo 74,2% prueba positiva con el ejercicio, aun cuando se exigió una caída del VEF₁ del 10%. Si se hubiera considerado positiva una disminución del 20% del VEF₁, similar a la exigida en la prueba de histamina, sólo 48,4% de los pacientes estudiados tendrían prueba de esfuerzo positiva. Observaciones similares se han hecho en adultos: Anderton y cols. en 1979⁶ concluyeron que la prueba de histamina era superior al ejercicio para demostrar un aumento de la reactividad bronquial inespecífica. Chatman y cols.⁷ han demostrado, recientemente, que las pruebas de histamina y metacolina permiten diferenciar mejor a los normales de los asmáticos que la prueba de ejercicio. En niños, Mellis y cols.⁵ utilizando la técnica de dosis acumulativa de histamina y el esfuerzo en cinta rodante, comunican 90% de resultados positivos con histamina y 74% con ejercicio.

Dado que en los estudios con histamina publicados en niños se usa un método diferente⁵⁻¹⁴, no existe información sobre la dosis umbral normal. Por ello, presumimos un valor igual que el de los adultos, que es, en nuestra experiencia, de 8 mg/ml y en la de Woolcock¹⁵ de 5 mg/ml. Si consideramos como normal esta última cifra el

porcentaje de positividad de la prueba de histamina en nuestros casos descenderá de 97 a 94%.

A diferencia de lo observado por Mellis y cols.⁵, en el presente estudio se encontró una correlación significativa entre el VEF₁ basal y la dosis umbral de histamina lo que significa que, como grupo, los niños que fueron estudiados con mayor obstrucción bronquial inicial presentaron una hiperreactividad mayor. Este hallazgo confirma la conveniencia de realizar las pruebas de provocación con VEF₁ basal superior al 70% del teórico con el propósito de no sobrevalorar la reactividad bronquial²⁻¹¹.

En 9 de los niños del presente estudio esta exigencia no pudo ser cumplida y la prueba se realizó con VEF₁ basal inferior a 70%: en 4 en ambas pruebas y en 5 en la segunda de ellas. Si bien esto haría objetable estos resultados, cabe destacar que no se observó una tendencia sistemática a una menor Pc_{20} a una mayor caída del VEF₁ en aquéllos con menor VEF₁ basal.

La falta de correlación del VEF₁ previo al ejercicio y la caída máxima del VEF₁ post-ejercicio observada en nuestros pacientes también difiere de lo comunicado por Mellis y col.⁵ quienes encontraron que el flujo espiratorio forzado entre el 25 y 75% de la CV (FEF₂₅₋₇₅) de los niños que se obstruyeron con ejercicio era significativamente menor que el de los que no se obstruyeron. Esta discordancia podía deberse, por una parte, a que estos autores utilizaron para valorar la obstrucción el FEF₂₅₋₇₅ que es más sensible que el VEF₁ y, por otra parte, al diferente tipo de ejercicio realizado, pues los pacientes de Mellis y cols. lo realizaron durante 6 minutos, en una cinta rodante ubicada dentro de un edificio⁵.

En los últimos años se ha logrado establecer que el estímulo que desencadena la broncoconstricción después del ejercicio es el enfriamiento y la desecación de la vía aérea por la hiperventilación, de modo que no se requiere de la actividad corporal en sí misma para provocar la broncoconstricción¹⁶⁻¹⁷. Esta dependencia de las condiciones físicas del aire inspirado hace necesario conocer la magnitud de la ventilación, la temperatura y la humedad del aire inspirado para comparar adecuadamente pruebas de esfuerzo, factores que no fueron medidos en el presente estudio como tampoco en el de Mellis⁵, pudiendo explicar algunas de las diferencias observadas.

Como índice de la intensidad del ejercicio físico se utiliza la frecuencia cardíaca. Esta debe alcanzar cifras cercanas a los 180/min⁴⁻⁵⁻¹⁸. En nuestros pacientes se logró un promedio de $184,58 \pm 12,7$ latidos por minuto. De los 5 niños

que alcanzaron frecuencia cardíaca inferior a 170 latidos por minuto sólo 1 no sufrió obstrucción y por otra parte, 2 de los 12 niños con frecuencias cardíacas iguales o superiores a 190 latidos por minuto tampoco tuvieron obstrucción bronquial post-ejercicio. Estos hallazgos hacen improbable que una insuficiente intensidad del ejercicio sea responsable de su menor sensibilidad como prueba de reactividad bronquial.

Una de las limitaciones de la prueba de esfuerzo es la imposibilidad de controlar la magnitud de la obstrucción provocada que, con alguna frecuencia, puede alcanzar niveles muy acentuados. En el presente estudio 3 niños tuvieron una caída del VEF₁ superior al 50% acompañada de importante disnea. Además, la suma del agotamiento físico y de la disnea puede llegar a ser muy uncomfortable.

La prueba de histamina en incrementos sucesivos, tiene la ventaja de que produce broncoconstricción en forma progresiva y controlable, pudiendo suspenderse la prueba cuando se registra una caída moderada del VEF₁ que, generalmente, no se acompaña de disnea muy importante. Además, el efecto de la histamina es transitorio y las molestias secundarias aparecen, generalmente, con concentraciones altas. En nuestro estudio dos niños experimentaron cefalea; tres eritema facial transitorio y dos broncoespasmo suficientemente acentuado como para tener que emplear broncodilatadores.

Las pruebas de provocación con drogas dependen del grado de obstrucción bronquial inicial¹⁹ y de la gravedad del asma valorada a través de la medicación utilizada para controlar los síntomas²⁻¹¹⁻²⁰. Entre los factores inherentes al método mismo el más importante es la cantidad de drogas inhalada²¹ la que depende fundamentalmente del suministro que de el nebulizador. Por este hecho es imprescindible usar siempre nebulizadores de entrega similar.

La menor sensibilidad del ejercicio en relación a la histamina en nuestros casos no puede atribuirse a diferencias en el grado de obstrucción previo a la realización de ambas pruebas pues el VEF₁ inicial fue semejante.

Si bien la provocación con histamina dio resultados positivos con más frecuencia que el ejercicio, en uno de los pacientes ambas pruebas fueron negativas. En estos casos es posible que la provocación mediante hiperventilación con aire frío y seco pudiera ser más sensible²². Anderton y col.⁶ han comunicado que la prueba de ejercicio es negativa si la dosis umbral de histamina es superior a 3 mg/ml. En el presente estudio 2 de los niños con dosis umbral superior a 3 mg/ml tuvieron prueba positiva de ejercicio por lo que no nos es posible adoptar esta rela-

ción entre el valor de la Pc₂₀ y la positividad de la prueba con ejercicio.

En resumen, la curva dosis respuesta obtenida por inhalación de histamina es más sensible que el ejercicio para el diagnóstico de asma en el niño y tiene las ventajas de ser simple, bien tolerada y no presentar riesgos.

RESUMEN

Con el propósito de comparar el rendimiento de las pruebas de provocación bronquial con ejercicio físico y con histamina en el diagnóstico de asma bronquial, se estudiaron 31 niños asmáticos entre 5 y 14 años. El ejercicio consistió en carrera al aire libre durante ocho minutos. La histamina se administró por aerosol durante respiración tranquila. La obstrucción bronquial post-ejercicio se midió con la máxima caída del VEF₁ a los 5, 10 y 15 minutos después del esfuerzo. Se consideró positiva una caída máxima superior al 10%. En la prueba de histamina se calculó la Pc₂₀ o concentración de histamina que produce un 20% de caída del VEF₁. En 97% de los niños disminuyó la Pc₂₀ con histamina ($\bar{x}$ 1,37 mg/ml $\pm$ 1,8 DS) comparado con sólo un 74% de reducciones significativas del VEF₁ post ejercicio ($\bar{x}$ 21,37 $\pm$ 17,32 DS).

Se encontró una correlación significativa $r = 0,408$ $p < 0,05$ entre Pc₂₀ histamina y máxima caída VEF₁ post-ejercicio. La Pc₂₀ histamina se relacionó significativamente con el VEF₁ previo a la prueba ($r = 0,464$ $p < 0,01$) en cambio la caída del VEF₁ post ejercicio no estuvo relacionada con el VEF₁ previo ($r = 0,161$).

Los resultados demuestran el mayor rendimiento de la prueba de histamina comparada con el ejercicio en el diagnóstico de asma bronquial en el niño, y sugieren que este último no es un buen índice para demostrar hiperreactividad bronquial en el niño.

REFERENCIAS

- ¹ American Thoracic Society. Committee of diagnostic standards for non-tuberculous disease. Definition and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. Am. Rev. Respir. Dis. 85: 762, 1972.
- ² Cockcroft D.W., Killian D.N., Mellon J.J.A., Hargreave F. E. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a clinical survey. Clin Allergy 7: 235, 1977.
- ³ Chai H., Farr R.S., Froehlich L.A., Mathison D.A., McLean J.A., Rosenthal R.R., Sheffer A.L., Spector S.L., Townley R.G. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. J Allergy Clin Immunol 56: 323, 1975.
- ⁴ Silverman M., Anderson S.D. Standardization of exercise tests in asthmatic children. Arch Dis Child 74: 882, 1972.

- ⁵ Mellis C.M., Kattan M., Keens T.G., Levison H. Comparative study of histamine and exercise challenges in asthmatic children. *Am Rev Respir Dis* 117:991, 1978.
- ⁶ Anderton R.C., Cuff M.T., Frith P.A., Cockcroft D.W., Morse J.L.C., Jones N.L., Hargreave F.E. Bronchial responsiveness to inhaled histamine and exercise. *J Allergy Clin Immunol* 63: 315, 1979.
- ⁷ Chatham M., Bleeker E.R., Smith P.L., Rosenthal R.R., Mason P., Norman P.S. A comparison of histamine, methacholine, and exercise airway reactivity in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 126: 235, 1982.
- ⁸ Bar-Or O., Neuman I., Dotan R. Effects of dry and humid climates on exercise-induced asthma in children and preadolescents. *J Allergy Clin Immunol* 60: 163, 1977.
- ⁹ Strauss R.H., McFadden E.R., Ingram R.H., Jaeger J.J. Enhancement of exercise-induced asthma by cold air. *New Engl J Med* 297: 743, 1977.
- ¹⁰ Strauss R.H., McFadden E.R., Ingram R.H., Deal E.C., Jaeger J.J. Influence of heat and humidity on the airway obstruction induced by exercise in asthma. *J Clin Invest* 61: 433, 1978.
- ¹¹ Moreno R., Anabalón H., Cruz E., Contreras G., Lisboa C. La curva de respuesta a la histamina en el diagnóstico y tratamiento del asma bronquial. *Rev Med Chile* 110: 426, 1982.
- ¹² Cereceda J., Atisha J., Calleja O., Cruz E., Lisboa C. Valores normales de flujos espiratorios máximos en niños. *Rev Med Chile* 104: 519, 1976.
- ¹³ Snedecor G.W., Cochran W.G. Statistical methods. 6th ed. Iowa, The Iowa State University Press, 1967.
- ¹⁴ Bhagat R., Grunstein M.M. Comparison of responsiveness to methacholine, histamine, and exercise in subgroups of asthmatic children. *Am Rev Respir Dis* 129: 221, 1984.
- ¹⁵ Woolcock A.J., Dowse G.K., Temple K., Stanley H., Alpers M.P., Turner K.J. The prevalence of asthma in the South-Fore people of Papua New Guinea. A method for field studies of bronchial reactivity. *Eur J Respir Dis* 64: 571, 1983.
- ¹⁶ Deal E.C., McFadden E.R., Ingram R.H., Strauss R.H., Jaeger J.J. Role of respiratory heat exchange in production of exercise-induced asthma. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol* 46: 461, 1979.
- ¹⁷ Zeballos R.J., Shturman-Elstein R., McNally J.F., Hirsch J.E., Souhrada J.F. The role of hyperventilation in exercise-induced bronchoconstriction. *Amer Rev Respir Dis* 118: 877, 1978.
- ¹⁸ Neljens H.J., Duiverman E.J., Kerrebijn K.R. Bronchial Responsiveness in Children. *Pediatric Clin North Amer* 30: 829, 1983.
- ¹⁹ Chung K.F., Morgan B., Keyes S.J., Snashall P.D. Histamine dose-response relationships in normal and asthmatic subjects. The importance of starting airway caliber. *Am Rev Respir Dis* 126: 849, 1982.
- ²⁰ Juniper E.F., Frith P.A., Hargreave F.E. Airway Responsiveness to histamine and methacholine. Relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 36: 575, 1982.
- ²¹ Ryan G., Dolovich M.B., Obmiski G., Cockcroft D.W., Juniper E., Hargreave F.E., Newhouse M.T. Standardization of inhalation provocation tests: influence of nebulizer output, particle size, and method of inhalation. *J Allergy Clin Immunol* 67: 156, 1981.
- ²² Deal E.C., McFadden E.R., Ingram R.H., Breslin F.J., Jaeger J.J. Airway responsiveness to cold air and hyperpnea in normal subjects and in those with hay fever and asthma. *Am Rev Respir Dis* 121: 621, 1980.