

lekarz Krzysztof Specjalski

Rola zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu astmy u chorych mieszkających na terenie województwa pomorskiego

rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Klinika Alergologii

Katedry Pneumonologii i Alergologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: prof. dr hab. Ewa Jassem

Gdańsk, 2009

Lista stosowanych skrótów

BAL	(ang. <i>bronchoalveolar lavage</i>) płukanie oskrzelikowo-pęcherzykowe
<i>Ch. pneumoniae, CP</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
ECP	(ang. <i>eosinophil cationic protein</i>) eozynofilowe białko kationowe
ELISA	(ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) test immunoenzymatyczny
FEV₁	(ang. <i>forced expiratory volume in first second</i>) natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
GINA	(ang. <i>Global Initiative for Asthma</i>) - Światowa Inicjatywa Zwalczania Astmy
GKS	glikokortykosteroidy
IFN	interferon
Ig	immunoglobulina
IL	interleukina
MIF	mikroimmunofluorescencja
<i>M. pneumoniae, MP</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
PCR	(ang. <i>polymerase chain reaction</i>) polimerazowa reakcja łańcuchowa
PEF	(ang. <i>peak expiratory flow</i>) szczytowy przepływ wydechowy
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
TNF	(ang. <i>tumor necrosis factor</i>) czynnik martwiczyny nowotworu

Spis treści

	Str.
1. WSTĘP	
1.1. Definicja i epidemiologia astmy.....	5
1.2. Leczenie astmy. Kryteria pełnej kontroli objawów.....	6
1.3. Czynniki prowadzące do zaostrzeń astmy oraz pogarszające stopień kontroli objawów.....	7
1.4. <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	8
1.4.1 Biologia.....	8
1.4.2 Chorobotwórczość.....	10
1.4.3 Rozpoznawanie zakażeń.....	12
1.5. <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> a astma.....	14
1.5.1 Rola zakażeń <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> w indukcji astmy.....	15
1.5.2 Rola zakażeń <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> w przebiegu astmy.....	16
1.6. Prawdopodobne mechanizmy wpływu zakażeń <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> na rozwój i przebieg astmy.....	18
1.7. Wpływ eradykacji <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> na przebieg astmy.....	21
1.8. Uzasadnienie podjęcia badań.....	25
2. CEL PRACY	26
3. MATERIAŁ	27
4. METODY	29
4.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe.....	29
4.2. Badanie spirometryczne.....	29
4.3. Ocena stopnia ciężkości i stopnia kontroli objawów astmy.....	29
4.4. Punktowe testy skórne z powszechnie występującymi aeroalergenami.....	30
4.5. Oznaczanie w surowicy przeciwciał przeciwko <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	31

4.6. Oznaczanie obecności materiału genetycznego <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> w wydzielinie dróg oddechowych.....	32
4.6.1 Indukcja płwociny.....	32
4.6.2 Izolacja DNA.....	33
4.6.3 Oznaczenie obecności DNA <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> techniką PCR	33
4.7. Analiza statystyczna.....	35
5. WYNIKI.....	37
5.1. Charakterystyka badanych populacji (wyniki badania kwestionariuszowego).....	37
5.2. Stopień kontroli oraz ciężkości astmy w badanej grupie.....	38
5.3. Częstość występowania alergii.....	38
5.4. Częstość występowania serologicznych cech zakażenia <i>Chlamydia pneumoniae</i>	39
5.5. Częstość występowania serologicznych cech zakażenia <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	43
5.6. Wpływ zakażeń <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i> na poszczególne kryteria kontroli astmy.....	43
5.7. Kolonizacja dróg oddechowych przez <i>Chlamydia pneumoniae</i> i <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	44
5.8. Zakażenie <i>Chlamydia pneumoniae</i> lub <i>Mycoplasma pneumoniae</i> a alergja.....	45
6. DYSKUSJA.....	46
7. WNIOSKI.....	55
8. STRESZCZENIE	56
9. PIŚMIENNICTWO.....	60
10. ZAŁĄCZNIKI.....	75

1. WSTĘP

1.1 Definicja i epidemiologia astmy

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez raport GINA astma jest przewlekłą zapalną chorobą dróg oddechowych, w której uczestniczy wiele komórek i substancji przez nie uwalnianych. Przewlekłe zapalenie jest przyczyną nadreaktywności oskrzeli prowadzącej do nawracających epizodów świszczącego oddechu, duszności, ściskania w klatce piersiowej i kaszlu, występujących szczególnie w nocy i nad ranem. Epizodom tym towarzyszy rozlana obturacja oskrzeli o zmiennym nasileniu, często ustępująca samoistnie lub pod wpływem leczenia [1].

Liczba chorych na astmę szacowana jest na całym świecie na około 300 milionów. Częstość występowania astmy jest zróżnicowana w poszczególnych częściach świata wynosząc od 1 do 18% populacji. W Polsce choroba stanowi istotny problem zdrowotny zarówno wśród dorosłych jak i dzieci. Szacuje się, że dotkniętych jest nią ok. 9% dzieci oraz 5,5% dorosłych [2]. Astma jest częstą przyczyną absencji w pracy i szkole, istotnie ogranicza codzienną aktywność wielu chorych oraz, w przypadku niekorzystnego przebiegu, prowadzi do trwałego obniżenia jakości życia [3-5]. Stanowi ponadto źródło wielu kosztów bezpośrednich i pośrednich. Jest zatem istotnym problemem medycznym, społecznym i ekonomicznym [6,7].

Pomimo stale poszerzającej się wiedzy na temat patomechanizmu astmy nadal nie do końca poznane są czynniki prowadzące do jej rozwoju oraz przyczyny wzrostu chorobowości. Z pewnością do zachorowania usposabiają predyspozycje genetyczne, atopia, ekspozycja na alergenów i nadreaktywność oskrzeli [8-12]. Istnieją także poparte licznymi badaniami przypuszczenia, że do rozwoju astmy mogą prowadzić zakażenia układu oddechowego, zwłaszcza o etiologii wirusowej lub wywołane przez atypowe bakterie – *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*.

1.2 Leczenie astmy. Kryteria pełnej kontroli objawów

Astma jest przewlekłą chorobą o zmiennym przebiegu, w którym okresy remisji przeplatają się z zaostrzeniami zaburzeń oddechowych (duszności, kaszlu, świszczącego oddechu) i z pogorszeniem parametrów spirometrycznych typowych dla obturacji oskrzeli. Ponadto możliwe jest występowanie krótkotrwałych epizodów ustępujących samoistnie lub po zastosowaniu leku.

Celem leczenia astmy jest osiągnięcie pełnej kontroli objawów definiowanej przez raport GINA jako występowanie objawów dziennych nie częściej niż dwa razy w tygodniu, nieobecność dolegliwości nocnych, nieograniczona aktywność fizyczna, zapotrzebowanie na leki doraźnie nie częściej niż dwa razy na tydzień oraz nieobecność zaostrzeń. Zadowalająca kontrola objawów astmy możliwa jest dzięki kompleksowym działaniom obejmującym stałą farmakoterapię, unikanie alergenów, edukację i rehabilitację chorych, a także odpowiednie leczenie zaostrzeń [1]. Do przerywania napadów duszności stosuje się krótko działające β -adrenomimetyki. Spośród leków kontrolujących przebieg choroby najskuteczniejsze i najszerszej stosowane są wziewne glikokortykosteroidy (GKS). W razie potrzeby zaleca się także używanie długo działających β -adrenomimetyków, antagonistów receptorów leukotrienowych, metyloksantyn, doustnych glikokortykosteroidów i kromonów, zaś w wybranych przypadkach ciężkiej IgE-zależnej astmy – omalizumabu.

W ocenie stopnia opanowania objawów astmy wykorzystuje się poza cytowaną klasyfikacją GINA również Test Kontroli Astmy (ang. *Asthma Control Test*, ACT) oraz Kwestionariusz Kontroli Astmy (ang. *Asthma Control Questionnaire*, ACQ) [13]. Dodatkowo w celu oceny czynności dróg oddechowych wykonuje się badanie spirometryczne z próbą rozkurczową oraz codzienne badanie szczytowego przepływu wydechowego (PEF, ang. *peak expiratory flow*). Nasilenie procesu zapalnego w błonie śluzowej oskrzeli można badać oznaczając frakcję tlenku azotu (NO) w wydychanym powietrzu (FeNO) lub parametry stanu

zapalnego w płucach [14-16]. W przypadku stwierdzenia braku lub niepełnej kontroli objawów należy ustalić i, o ile to możliwe, usunąć przyczynę niepowodzenia oraz modyfikować leczenie przez zwiększenie dawki lub włączenie kolejnego leku przeciwzapalnego.

Pomimo stale poszerzającej się wiedzy na temat patomechanizmu i możliwości leczenia astmy oraz ukierunkowania terapii na zapewnienie chorym dobrej jakości życia, objawy choroby są często trudne do opanowania [17,18]. W 5-10 % przypadków rozpoznaje się astmę trudną do leczenia (ang. *difficult-to-treat asthma*), co oznacza brak kontroli objawów pomimo stosowania odpowiednich dawek dwóch lub więcej leków kontrolujących przebieg choroby [19]. Dane te skłaniają do prowadzenia dalszych badań poświęconych optymalnej strategii postępowania w zakresie prewencji zaostrzeń oraz lepszego opanowania objawów.

1.3 Czynniki prowadzące do zaostrzeń astmy oraz pogarszające stopień kontroli objawów

Istotny wpływ na przebieg astmy ma ekspozycja na alergenów (roztoczy kurzu domowego, pyłków roślin, zarodników grzybów, sierści zwierząt itp.), zmiany temperatury i wilgotności powietrza oraz nieswoiste czynniki drażniące, np. dym tytoniowy, pyły, czynniki zawodowe. U osób z nadwrażliwością na kwas acetylosalicylowy do zaostrzeń prowadzić może przyjęcie leku z grupy NLPZ lub pokarmu zawierającego salicylany. Złej kontroli objawów sprzyjają także niektóre choroby współistniejące np. refluks żołądkowo-przełykowy, alergiczny nieżyt nosa, przewlekłe zapalenie zatok [20-22]. W ostatnim czasie zwraca się również uwagę na niekorzystny wpływ otyłości oraz zmian hormonalnych. U niektórych chorych niezadowalające wyniki leczenia wynikają z niestosowania się do zaleceń lekarza, niewłaściwego stosowania leków bądź z przyczyn psychospołecznych.

W występowaniu zaostrzeń istotną rolę odgrywają zakażenia układu oddechowego, zwłaszcza wirusowe lub wywołane atypowymi bakteriami [23]. Szacuje się, że zakażenia rinowirusami, adenowirusami, wirusami grypy i paragrypy związane się z ok. 80% zaostrzeń astmy u dzieci i ok. 40% u dorosłych [24 - 26]. Wpływ zakażeń atypowymi bakteriami na przebieg astmy nie został dotychczas jednoznacznie określony.

1.4 *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*

1.4.1 Biologia

Chlamydia pneumoniae należy do rzędu *Chlamydiales*, rodziny *Chlamydiaceae*, rodzaju *Chlamydia*, którego przedstawicielami są także trzy inne gatunki bakterii chorobotwórczych: *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* oraz *Chlamydia pecorum*. *Chlamydia pneumoniae* została opisana jako odrębny gatunek dopiero w 1989r., wcześniej klasyfikowana była jako szczep TWAR *Chlamydia psittaci*. W strukturze antygenowej bakterii wyróżniamy grupowo swoisty kompleks lipopolisacharydowy (LPS) oraz białka swoiste gatunkowo, np. białko błony zewnętrznej omp (ang. *outer membrane protein*) [27].

Chlamydia pneumoniae jest pasożytem bezwzględnie wewnątrzkomórkowym, który nie może rozmnażać się poza organizmem człowieka. W czasie cyklu rozwojowego występuje w dwóch postaciach: ciała elementarnego i ciała siateczkowatego (retikularnego). Ciała elementarne (ang. *elementary bodies*, EB) o średnicy ok. 300nm i gruszkowatym kształcie są formą zakaźną. Nie mają one możliwości prowadzenia własnego metabolizmu i wytwarzania ATP, a tym samym – są pozbawione zdolności do rozmnażania się. Po wnikięciu do komórki żywiciela ciało elementarne powiększa się kilkukrotnie i przekształca w ciało siateczkowate (ang. *reticulate body*, RB). Jest to forma wegetatywna, korzystająca z zasobów energetycznych komórek żywiciela a przez to zdolna do rozmnażania. W ciągu kilkudziesięciu godzin od zakażenia dochodzi do namnożenia przez podział poprzeczny

ciałek siateczkowatych i utworzenia wewnątrzkomórkowego wtrętu. W jego obrębie ciała siateczkowate przekształcają się w ciała elementarne. Wypełniony ciałkami elementarnymi wtręt pęka, dochodzi do uszkodzenia komórki gospodarza i uwolnienia *Chlamydii*. Nowo powstałe ciała elementarne są zdolne do zarażania kolejnych zdrowych komórek. Opisany cykl rozwojowy trwa ok. 72 godziny [28].

Mycoplasma pneumoniae należy do klasy *Mollicutes*, rzędu *Mycoplasmatales*, rodziny *Mycoplasmataceae*. Niektóre spośród innych gatunków należących do rodzaju *Mycoplasma* są patogenami (np. *M. hominis*, *M. genitalum*) lub komensalami jamy ustnej (*M. orale*, *M. buccale*, *M. salivarium*) [29].

Komórki *M. pneumoniae* mają średnicę ok. 300 nm. Jest to zatem jeden z najmniejszych organizmów zdolnych do samodzielnego życia. Brak ściany komórkowej czyni tę bakterię wrażliwą na zmiany ciśnienia osmotycznego i oporną na antybiotyki z grupy β -laktamów. Jest zdolna do czasowego bytowania wewnątrz komórek gospodarza, choć, w przeciwieństwie do *Chlamydia pneumoniae*, nie jest pasożytem bezwzględnie wewnątrzkomórkowym. Wykazuje szczególną predylekcję do komórek nabłonka rzęskowego dróg oddechowych.

Patogen został po raz pierwszy wyizolowany przez Eatona w roku 1944. Stąd pochodzi jego pierwotna nazwa – „czynniki Eatona”. Pierwsze badania związane z chorobotwórczością *Mycoplasma pneumoniae* przeprowadzono w latach 40. u chorych na „pierwotną atypową pneumonię”. Pojęcie atypowego zapalenia płuc wprowadzono ze względu na brak klinicznej poprawy po stosowaniu sulfonamidów i nietypowy dla zapalenia bakteryjnego obraz radiologiczny.

1.4.2 Chorobotwórczość

Chlamydia pneumoniae należy do częstszych patogenów wywołujących zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych [30]. Szacuje się, że odpowiada za 10% zapaleń płuc oraz 5% zapaleń oskrzeli. Infekcja przenoszona jest drogą kropelkową, co tłumaczy częste występowanie epidemii zachorowań w środowiskach zamkniętych takich jak koszary, domy dziecka, zakłady opiekuńcze czy szkoły z internatami. Przebieg choroby bywa zazwyczaj łagodny. Dominującymi objawami są: kaszel, gorączka, ból gardła, chrypka. Cięższy przebieg możliwy jest u osób w podeszłym wieku lub obciążonych zaburzeniami odporności. Zakażenie *Chlamydia pneumoniae* może także, choć rzadziej, przebiegać jako zapalenie ucha środkowego, stawów, wątroby, węzłów chłonnych czy tęczówki.

O powszechności zakażeń świadczy częste występowanie przeciwciał przeciw *Chlamydia pneumoniae* w ogólnej populacji. W badaniu Ferrari i wsp. w grupie młodych dorosłych (20-44 lata) cechy przebytej infekcji stwierdzono u 58,8% mężczyzn oraz 39,6% kobiet [31]. U 10,6% badanych stwierdzono cechy obecnego lub niedawno przebytego zakażenia. Niezależnymi czynnikami ryzyka okazały się być: płeć męska oraz palenie tytoniu. W badaniu Myashita i wsp. spośród 1018 dorosłych w wieku 22-50 lat zakażenie przebyło 60% (64% mężczyzn oraz 58% kobiet) [32].

Co istotne, zakażenie *Chlamydia pneumoniae* często przechodzi w fazę przewlekłą, klinicznie skąpo- lub bezobjawową. Ten przewlekły proces zapalny wiązany jest przez niektórych badaczy z patogenezą choroby wieńcowej, zapalenia wsierdza, miażdżycy, nadciśnienia tętniczego, zapalenia naczyń, stwardnienia rozsianego, sarkoidozy a także astmy [33-35]. Pojedyncze prace wskazują na zakażenie *Chlamydia pneumoniae* jako czynnik rozwoju niektórych chorób nowotworowych, np. raka płuca czy chłoniaków nieziarniczych [36-38]. W większości przypadków brak jest jednak przekonujących dowodów jednoznacznie potwierdzających związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy zakażeniem a indukcją choroby.

Mycoplasma pneumoniae wywołuje zakażenia dróg oddechowych, do których dochodzi zwłaszcza wiosną i jesienią. Jest również jednym z najważniejszych czynników etiologicznych zapaleń płuc [39,40]. Po okresie inkubacji trwającym 2-3 tygodnie stopniowo narastają objawy - kaszel, duszność, ból gardła, nieżyt nosa. Spośród objawów spoza układu oddechowego najczęstsze są: gorączka, nudności, wymioty, bóle głowy, dreszcze, nocne poty [41]. Choroba ma zazwyczaj charakter łagodny i samoograniczający. W cięższych przypadkach, np. u chorych z zaburzeniami odporności, stwierdza się wysięk w jamach opłucnej oraz niewydolność oddechową [42].

Podobnie jak w przypadku *Chlamydia pneumoniae* szczególnie narażone na zakażenie są osoby żyjące w zamkniętych społecznościach, zwłaszcza młodzi dorośli (skoszarowani żołnierze, uczniowie i studenci mieszkający w internatach lub domach studenckich). Epidemie zachorowań zdarzają się co 3-5 lat. Cechy zakażenia występują wówczas u 65-90% populacji zamieszkującej ognisko epidemii. Bardzo częsty jest przebieg skąpo- lub bezobjawowy, przez co częstość zakażeń bywa niedoszacowana.

U wielu chorych po ustąpieniu objawów ostrej fazy zakażenia przez wiele tygodni utrzymuje się uporczywy kaszel będący wyrazem nadreaktywności oskrzeli, której istnienie potwierdzono również na modelu zwierzęcym [43]. Do powikłań zakażenia należą: niedokrwistość hemolityczna, ostre zapalenie trzustki, zapalenie ucha, powikłania neurologiczne (zapalenie mózgu, opon mózgowo-rdzeniowych, porażenie połowicze, zespół Guillain-Barre), rumień wielopostaciowy, rumień guzowaty, zespół Stevens-Johnsona [44]. *Mycoplasma pneumoniae*, podobnie jak *Chlamydia pneumoniae*, jest wrażliwa na antybiotyki z grupy makrolidów i tetracyklin.

1.4.3 Rozpoznawanie zakażeń

W praktyce klinicznej rozpoznanie zakażenia atypowym patogenem opiera się na danych z wywiadu, znajomości epidemiologii, badaniu fizykalnym oraz radiologicznych, serologicznych i mikrobiologicznych badaniach dodatkowych. Najczęstszymi objawami klinicznymi zakażenia są: męczący kaszel, ból gardła, chrypka, nieżyt nosa, gorączka, objawy „grypopodobne”, rzadziej – bóle stawowe, bóle i zawroty głowy, nudności i wymioty. Nie ma swoistych objawów pozwalających na ustalenie rozpoznania. W badaniu radiologicznym klatki piersiowej stwierdza się nieswoiste zmiany zapalne mięszu płucnego, okołoskrzelowe oraz odczyn węzłowy. Często zwraca uwagę dysproporcja pomiędzy skąpych objawami klinicznymi a rozległymi zmianami w obrazie radiologicznym.

Mikrobiologiczna diagnostyka chorób wywołanych przez bakterie atypowe była zawsze utrudniona przez brak jednego, standaryzowanego testu, który jednoznacznie potwierdziłby lub wykluczył zakażenie. Ponadto niełatwe było pozyskiwanie materiału z dolnych dróg oddechowych do badań mikrobiologicznych.

Obecnie podstawowym badaniem dodatkowym pomocnym w rozpoznawaniu zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* jest wykrywanie swoistych przeciwciał w surowicy chorych. W tym celu wykorzystywana jest technika mikroimmunofluorescencji (MIF) lub test immunoenzymatyczny ELISA [45]. Czułość w odniesieniu do *Chlamydia pneumoniae* wynosi w MIF 66-100%, dla testu ELISA- 42-96% zaś swoistość: 97-100% w MIF i 88-100% dla ELISA [46]. Metodą o historycznym znaczeniu jest odczyn wiązania dopełniacza (OWD) umożliwiający wykrycie nieswoistych gatunkowo przeciwciał przeciw bakteryjnym lipopolisacharydom (LPS).

W przypadku *Chlamydia pneumoniae* przeciwciała klasy M pojawiają się w 3 tygodniu po zakażeniu i utrzymują się w surowicy przez 2-6 miesięcy. Przeciwciała klasy G pojawiają się 6-8 tygodni po zakażeniu i utrzymują się kilka lat. Reinfekcja charakteryzuje się znacznie

szybszym wzrostem stężenia przeciwciał klasy G. Dogodnym markerem służącym do monitorowania przewlekłego zakażenia jest natomiast stężenie przeciwciał klasy A, które w prawidłowo zwalczanym zakażeniu obniża się szybko po powrocie do zdrowia, natomiast w fazie przewlekłej pozostaje stabilnie podwyższone. Przy zastosowaniu MIF przyjętymi powszechnie kryteriami diagnostycznymi ostrej infekcji pierwotnej są: miana IgM > 1:16, IgG > 1:512 lub czterokrotny wzrost miana IgG. W reinfekcji stwierdza się IgA > 1:32; 1:16 < IgG < 1:512. O przebyciu zakażenia w przeszłości świadczą miana przeciwciał IgG powyżej 1:32 oraz IgA powyżej 1:8.

Oprócz badań serologicznych stosowane są techniki hodowlane. W przypadku *Chlamydia pneumoniae* namnażanie odbywa się na liniach komórkowych (np. Hela 229, HL, BHK-21, HEp-2), zaś *Mycoplasma pneumoniae* hodowana jest na wzbogaconych podłożach z białkiem i cholesterolem (wyciąg mięsny, pepton, surowica końska, wyciąg drożdży). Kolonie mają rozmiar 10-2000 µm. Posiadają centrum wrośnięte w głąb podłoża oraz strefę wzrostu powierzchniowego (wygląd „sadzonego jaja”). Czas wzrostu jednej generacji to 19 godzin. Ze względu na czasochłonność metody hodowlane są rzadko stosowane w praktyce klinicznej. Coraz częściej natomiast wykorzystuje się technikę PCR do wykrywania materiału genetycznego patogenów w płynie z płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego, indukowanej płwocinie lub wymazach z nosogardzieli [45]. Umożliwia ona wykrycie nawet niewielkiej liczby kopii genomu w materiale. W diagnostyce zakażenia *Chlamydia pneumoniae* wykorzystuje się startery wiązane przez gen *ompA*, zaś w przypadku *Mycoplasma pneumoniae* – gen białka adhezyjnego P1 lub fragment genu 16s rDNA. Dzięki technice PCR możliwe jest wykrywanie obecności zarówno żywych jak i martwych patogenów, co istotnie zmniejsza ograniczenia dotyczące transportu materiału. Z drugiej jednak strony brak możliwości zróżnicowania DNA bakterii żywych i martwych (np. w wyniku stosowanej terapii) może wpływać niekorzystnie na decyzje dotyczące leczenia. Niedogodności tej jest

pozbawiona technika rtPCR wykrywająca mRNA, a tym samym pozwalająca zidentyfikować jedynie patogeny aktywne metabolicznie.

1.5 *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* a astma

Związki pomiędzy zakażeniami a astmą są opisywane od dawna. Według tzw. hipotezy higienicznej wzrost częstości występowania chorób alergicznych wynika z eliminacji pospolitych chorób zakaźnych wieku dziecięcego, m.in. w wyniku szczepień profilaktycznych. Z drugiej strony wykazano rozwój nadreaktywności oskrzeli i astmy jako rezultat zakażenia. Dotyczy to zwłaszcza tzw. astmy nieatopowej – rozpoczynającej się u osób dorosłych i przebiegającej bez klinicznie istotnych alergii.

Zjawisko infekcyjnej indukcji astmy poznano do tej pory najlepiej w odniesieniu do zakażeń wirusowych, zwłaszcza adenowirusami, RSV i rinowirusami [47–51]. Wywołują one odpowiedź immunologiczną typu Th2 związaną z wytwarzaniem IL 4, IL 5, które są cytokinami odgrywającymi także istotną rolę w patomechanizmie chorób alergicznych [52,53]. Adenowirus wywołuje często zakażenia latentne. Nie dochodzi w nich do replikacji drobnoustroju a jedynie produkcji części jego białek. Według niektórych badaczy prowadzi to m.in. do zwiększenia ekspresji genów związanych z przewlekłym, tytoniozależnym procesem zapalnym w POCHP [54].

Mniej wiadomo na temat możliwości indukowania astmy przez bakterie. W tej grupie organizmów najwięcej danych dostarczyły badania dotyczące bakterii atypowych (zwłaszcza *Chlamydia*), wywołujących przewlekłe zakażenia.

1.5.1 Rola zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w indukcji astmy

Według niektórych badaczy zakażenia bakteryjne mogą odgrywać pewną rolę w inicjacji astmy u osób dotychczas zdrowych. Dotyczy to zwłaszcza przypadków tzw. „astmy o późnym początku” (ang. *late-onset asthma*), nieatopowej, której pojawienie się jest poprzedzone objawami zakażenia wywołanego przez *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae* [55].

Wyniki prac obejmujących większą liczbę chorych są rozbieżne. Hahn jako pierwszy powiązał nowe zachorowania na astmę z zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* na podstawie stwierdzanej u części chorych serokonwersji [56]. W badaniu Sirmatela i wsp. potwierdzono częstsze występowanie istotnych mian przeciwciał klas G i A u chorych ze „świeżo” rozpoznaną astmą [57].

Z drugiej strony Korppi i wsp. nie stwierdzili istotnych różnic w stężeniach IgG i IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae* pomiędzy dziećmi w wieku 1-6 lat, u których rozwinęła się astma a zdrowymi [58]. Prace Larsena i Routes nie potwierdziły z kolei tych różnic w grupie osób dorosłych [59,60].

Pośrednio o związkach pomiędzy rozwojem astmy a zakażeniami świadczą również wyniki badań potwierdzających częste występowanie serologicznych cech przebytego w przeszłości lub przewlekłego, aktywnego zakażenia. Cook stwierdził cechy przebytego zakażenia u 35% chorych na astmę przewlekłą stabilną, Von Hertzen i wsp. u 43% kobiet i 64% mężczyzn chorych na astmę nieatopową [61]. Cechy przewlekłego zakażenia stwierdzono u 23-72% chorych [62,63].

Z drugiej strony nie brakuje prac przeczących powyższym obserwacjom. Barbaro i wsp. nie stwierdzili różnic w częstości występowania serologicznych cech przebytego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u 197 chorych na przewlekłą astmę i u osób zdrowych [64].

W cytowanych pracach różnie dobierano badanych oraz stosowano odmienną metodykę. O ile niektórzy autorzy poprzestawali na ocenie serologicznej, inni uzupełniali ją badaniami mikrobiologicznymi bądź molekularnymi (PCR płynu z popłuczyn oskrzelikowo-pęcherzykowych lub wymazów z nosogardzieli).

Rozbieżności w wynikach cytowanych prac skłaniają do podjęcia dalszych badań dotyczących wpływu zakażeń atypowymi bakteriami na rozwój i kontrolę astmy. Nie można wykluczyć, że częste współistnienie astmy i przewlekłego zakażenia może być związane nie tyle z indukcją choroby przez antygeny bakteryjne, co z większą podatnością chorych na zakażenia dróg oddechowych.

1.5.2 Rola zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu astmy

Zakażenia bakteriami atypowymi stanowią jedną z częstszych przyczyn zaostrzeń astmy. W badaniu Liebermana i wsp. obejmującym 100 dorosłych chorych hospitalizowanych z powodu zaostrzenia astmy serologiczne cechy zakażenia *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono u 18%, zaś *Chlamydia pneumoniae* - u 8% badanych [65]. Dane te różnią się jednak znacznie w zależności od badanej populacji i stosowanych metod diagnostycznych. Stąd w niektórych analizach cechy „świeżego” zakażenia *Chlamydia pneumoniae* stwierdza się u chorych z zaostrzeniem astmy często (np. Wark i wsp. - 38%), w innych – znacznie rzadziej (np. Allegra i wsp. - 8% zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i 2% - *Mycoplasma pneumoniae*) [66,67]. Nie brakuje wreszcie prac sugerujących marginalną rolę bakterii atypowych wynikającą z niewielkiej częstości zakażeń, nie różniącej się istotnie od zdrowej populacji [26,68]. Warto przy tym podkreślić różnice związane ze stosowanymi metodami diagnostycznymi. Aby je porównać w badaniu Myashita i wsp. zastosowano zarówno

diagnostykę serologiczną (MIF), PCR jak i hodowlę stwierdzając cechy zakażenia odpowiednio u 9%, 5,4% oraz 1,2% badanych [69].

Bakterie atypowe są również czynnikiem wpływającym istotnie na kontrolę astmy w populacji dziecięcej. W badaniu Cunninghama i wsp. polegającym na obserwacji i diagnostyce zaostrzeń u 108 dzieci cechy zakażenia *Chlamydia pneumoniae* stwierdzano zarówno w czasie zaostrzeń (23%) jak i w okresie dobrej kontroli objawów (28%). Natomiast stężenie przeciwciał IgA świadczące o przewlekłym zakażeniu było ponad siedmiokrotnie wyższe u chorych, którzy w trakcie obserwacji mieli cztery lub więcej zaostrzeń w porównaniu do zgłaszających jedno zaostrzenie [70]. Przytoczone wyniki wydają się potwierdzać przypuszczenie, że zakażenie *Chlamydia pneumoniae* i zaostrzenie astmy nie są dwoma niezależnie współistniejącymi zjawiskami, ale łączy je związek przyczynowo-skutkowy.

O ile ostrą formę zakażenia łatwo jest powiązać z zaostrzeniem astmy, o tyle rola przewlekłego zapalenia nie jest do końca wyjaśniona. Problem wydaje się istotny, gdyż kolonizacja dróg oddechowych przez *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae* jest znacznie częstsza u chorych na astmę w porównaniu ze zdrową populacją. Stąd przypuszczenie, że może ona przyczyniać się do pogorszenia kontroli choroby.

W badaniu Biscione i wsp. oceniającym częstość kolonizacji górnych dróg oddechowych przez *Chlamydia pneumoniae* u 74 par małżeńskich (jeden z małżonków chory na astmę, drugi – zdrowy) stwierdzono ją u 6,4% chorych na astmę i 2,3% zdrowych [71]. W populacji dziecięcej na podstawie materiału pozyskiwanego podczas bronchofiberoskopii kolonizację stwierdzono u 67% chorych [72]. Zespół Harju, przeciwnie, stwierdził występowanie kolonizacji przez *Chlamydia pneumoniae* z taką samą częstością w grupach chorych na astmę i zdrowych oraz brak zależności pomiędzy zakażeniem a ciężkością choroby [73].

Kolonizację dróg oddechowych przez *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono u 55% astmatyków i 9% osób zdrowych [74]. Dane te obarczone są jednak ryzykiem błędu. Pochodzą bowiem z pojedynczego badania przeprowadzonego na niewielkiej grupie.

Cytowane wyniki badań z zastosowaniem metod hodowlanych i molekularnych nie rozstrzygnęły jednoznacznie, czy istnieje związek pomiędzy przewlekłym zakażeniem atypowymi bakteriami a ciężkością lub stopniem kontroli astmy. Więcej danych na ten temat dostarczyły prace z zastosowaniem diagnostyki serologicznej.

W badaniu Blacka i wsp. grupa chorych na astmę, u której stwierdzono serologiczne cechy przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae*, cechowała się gorszą kontrolą objawów, niższymi wartościami FEV₁ oraz większym zapotrzebowaniem na wziewne steroidy w porównaniu z grupą kontrolną. Istniała przy tym odwrotna zależność pomiędzy mianem przeciwciał IgG a wartością FEV₁ [75]. Obserwacje te potwierdza badanie von Hertzen i wsp. Określono w nim stężenie przeciwciał klas G i A przeciw *Chlamydia pneumoniae* wśród 116 chorych na astmę stwierdzając związek pomiędzy mianem IgA i stopniem ciężkości choroby [76]. Z drugiej strony nie brakuje prac, które nie potwierdzają tych zależności [64].

1.6 Prawdopodobne mechanizmy wpływu zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na rozwój i przebieg astmy

Pomimo badań sugerujących związek pomiędzy zakażeniem bakteriami atypowymi a rozwojem i ciężkim przebiegiem astmy, patomechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony. Przypuszcza się, że przewlekłe zakażenie indukuje proces zapalny prowadzący do rozwoju nadreaktywności oskrzeli i astmy. Prowadzone do tej pory badania dotyczyły przede wszystkim roli *Chlamydia pneumoniae* w rozwoju astmy. Mniej wiadomo natomiast na temat ewentualnego wpływu *Mycoplasma pneumoniae* na indukcję przewlekłego zapalenia.

Stwierdzono, że zakażenie komórek nabłonkowych układu oddechowego oraz makrofagów przez *Chlamydia pneumoniae* powoduje wydzielanie cytokin prozapalnych i aktywuje komórki stanu zapalnego, których rolą jest neutralizacja patogenów. Dochodzi do zwiększenia wydzielania $\text{TNF}\alpha$, IL 1 β , IL 4, IL 6, IL 8 [77-79]. W badaniach *in vitro* stwierdzono także istotny wzrost wytwarzania interferonu β (IFN β) oraz czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) w komórkach mięśni gładkich oskrzeli. Substancje te, istotnie zwiększając proliferację komórek mięśniówki, przyczyniają się prawdopodobnie do rozwoju remodellingu u chorych na astmę z towarzyszącym przewlekłym zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* [80].

Udział w rozwoju astmy wydają się mieć także białka szoku termicznego (HSP) *Chlamydia pneumoniae*. Opisano ich rolę zarówno w inicjacji astmy jak i w patomechanizmie zaostreń [63]. Powodują one m.in. zwiększenie wytwarzania metaloproteinaz związanych z rozwojem remodellingu oskrzeli [81,82].

Istotny jest również antyapoptotyczny wpływ zakażenia na komórki, w których bytuje *Chlamydia pneumoniae* [83,84]. Apoptoza jest zjawiskiem fizjologicznym, koniecznym dla prawidłowego funkcjonowania tkanek. Odgrywa także znaczącą rolę podczas zakażenia patogenami wewnątrzkomórkowymi ograniczając ich rozprzestrzenianie się i wyzwalając odpowiedź zapalną. Zahamowanie apoptozy zapewnia bakterii ochronę przed układem immunologicznym gospodarza i umożliwia długotrwałe korzystanie z zasobów energetycznych zajętych komórek. Dochodzi również do hamowania proapoptotycznego wpływu glikokortykosteroidów na komórki stanu zapalnego, czym można tłumaczyć często niezadowalające efekty stosowania tych leków. Mediatorami odgrywającymi istotną rolę w tym procesie są $\text{TNF}\alpha$ oraz IL 8 [85]. Patomechanizm zahamowania apoptozy nie został w pełni poznany. Przypuszcza się, że dochodzi do blokady kilku szlaków pobudzających

proces m.in. do zapobiegania aktywacji kaspaz oraz wydzielania mitochondrialnego cytochromu c [86].

Zakażenie *Mycoplasma pneumoniae* prowadzi natomiast do wzmożonego wydzielania IL 5, IL 8 oraz TNF α [87]. Zmiany takie stwierdzono m.in. w grupie dzieci z cechami obturacji oskrzeli po przebyciu zakażenia tą bakterią [88]. Rozwój zmian zapalnych oraz pozapalnej nadreaktywności oskrzeli związanej z zakażeniem *Mycoplasma pneumoniae* został także opisany na modelu zwierzęcym. Powiązano go ze zmniejszeniem wytwarzania IFN γ oraz ekspozycją na alergen [43,89].

Do tej pory nie wyjaśniono, dlaczego tylko u niektórych osób dochodzi do przejścia zakażenia w fazę przewlekłą, podczas gdy w większości przypadków jest ono skutecznie zwalczane. Być może istnieje ku temu predyspozycja genetyczna. Niektórzy badacze wiążą częstszą zapadalność na zakażenia *Chlamydia pneumoniae* oraz na astmę z występowaniem polimorfizmu genu dla białka MBL (ang. *mannose-binding protein*) biorącego udział w ochronie komórek przed zakażeniem. Stwierdzono, że niektóre allele charakteryzują się mniejszą aktywnością, co związane było z częstszą zachorowalnością na zakażenia [90, 91].

Mechanizm wpływu atypowych bakterii na pogorszenie kontroli astmy również nie został dokładnie wyjaśniony. Z pewnością jest on wypadkową przewlekłego procesu zapalnego indukowanego przez zakażenie oraz stosowanego leczenia. Z jednej strony zatem dochodzi do wytwarzania cytokin prozapalnych odpowiedzialnych za zaostrzenie astmy i remodelling oskrzeli. Z drugiej strony – stosowana steroidoterapia, oprócz korzystnego działania przeciwzapalnego, wpływa istotnie na odpowiedź układu immunologicznego. Steroidy zmniejszają wytwarzanie IL 12 - cytokiny indukującej wytwarzanie IFN- γ a tym samym

odpowiedź komórkową (Th1) [92-94]. Jednocześnie zwiększają sekrecję IL 10 oraz TGFβ, co dodatkowo zwiększa odpowiedź humoralną (Th2) a zmniejsza komórkową (Th1) [95, 96].

W zakażeniach bakteriami atypowymi, które mogą bytować w komórkach gospodarza (np. w makrofagach), to właśnie sprawna odpowiedź komórkowa gwarantuje eliminację patogenu. Według niektórych badaczy prowadzi to do zjawiska błędnego koła - zakażenie nasila objawy astmy, zaś leczenie astmy uniemożliwia eliminację zakażenia [97].

1.7 Wpływ eradykacji *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na przebieg astmy

Opisane przypuszczenia doprowadziły do opracowania nowej strategii terapeutycznej. Zakładając bowiem, że astma jest wywoływana zakażeniem bakteryjnym, jego wyleczenie powinno prowadzić do poprawy kontroli choroby, a być może nawet do jej ustąpienia. Wpływ eradykacji *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na kontrolę astmy był oceniany w wielu badaniach, jednak większość z nich nie była kontrolowana placebo i obejmowała niewielkie grupy chorych [98,99]. Opublikowane w ostatnich latach prace, które są częściowo pozbawione tych niedoskonałości, w większości potwierdzają skuteczność eradykacji (Tabela I).

W badaniu Kraft i wsp. 55 chorych na astmę przewlekłą stabilną zakwalifikowano do sześciotygodniowego leczenia klarytromycyną lub *placebo*. Przed włączeniem leczenia przeprowadzono diagnostykę w kierunku zakażenia *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae* (badania serologiczne i hodowla) uzyskując pozytywny wynik u 31 badanych. Istotną poprawę w zakresie parametrów spirometrycznych oraz obniżenie stężenia TNFα, IL 5 i 12 w płucach oskrzelikowo-pęcherzykowych stwierdzono wyłącznie w grupie chorych zakażonych przynajmniej jedną z bakterii i leczonych antybiotykiem [100].

W wieloośrodkowym badaniu Blacka i wsp. uczestniczyło 232 chorych na astmę z serologicznymi cechami zakażenia *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae*. Badanym podawano przez 6 tygodni roksytromycynę (2 razy dziennie 150mg) lub *placebo*. Po zakończeniu terapii stwierdzono poprawę parametrów spirometrycznych w grupie leczonej antybiotykiem, ale była ona krótkotrwała [101].

Johnston i wsp. badali z kolei skuteczność telitromycyny u chorych wymagających hospitalizacji z powodu zaostrzenia astmy. Oprócz rutynowego leczenia stosowano przez 10 dni telitromycynę (2 razy dziennie po 400mg) lub *placebo*. Istotną poprawę w zakresie kontroli objawów oraz wartości FEV₁ stwierdzono w grupie otrzymującej antybiotyki. Co ciekawe, poprawa miała miejsce zarówno u chorych zakażonych *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae* jak i u tych, u których takiego zakażenia nie stwierdzono [102].

Pomimo obiecujących wyników niektórych badań, należy podkreślić, że korzystny wpływ makrolidów na kontrolę astmy może być niezależny od eradykacji *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae* i wynikać jedynie z przeciwzapalnej aktywności leków. Makrolidy zmniejszają ekspresję molekuł adhezji (endoteliny 1, ICAM-1) oraz IL 6, TNF α , IL 8, IL 1 β , skracają czas przeżycia granulocytów kwasochłonnych oraz hamują metabolizm glikokortykosteroidów znacząco wzmacniając ich działanie [85].

W pracach, w których nie był określany profil serologiczny badanych nie sposób określić, które z właściwości makrolidów zapewniły korzystny efekt kliniczny lub poprawę parametrów w zakresie badań czynnościowych.

Autorzy	Materiał	Potwierdzenie zakażenia	Schemat leczenia	Poprawa TAK/NIE	Uwagi
Kraft M. i wsp. [100]	55 chorych na astmę przewlekłą stabilną	PCR (płyn z BAL, wymazy z górnych dróg oddechowych) - <i>M. pneumoniae</i> lub <i>Ch. pneumoniae</i> u 31 chorych	klarytromycyna 2x500mg lub <i>placebo</i> 6 tygodni	TAK	W grupie leczonych klarytromycyną z potwierdzonym zakażeniem istotny statystycznie wzrost FEV ₁ oraz obniżenie stężenia TNF α , IL5, IL12 mRNA w płynie z BAL.
Black P. i wsp. [101]	232 chorych na astmę	U wszystkich serologiczne cechy zakażenia <i>Ch. pneumoniae</i> (IgG, IgA)	roksytromycyna 2x150mg lub <i>placebo</i> 6 tygodni	TAK	W grupie leczonej roksytromycyną istotny wzrost wieczornego PEF, efekt ograniczony do okresu antybiotykoterapii. Bez różnic w zakresie objawów klinicznych i jakości życia.
Johnston S. i wsp. [102]	278 chorych w okresie zaostrzenia astmy	Diagnostyka serologiczna, PCR, hodowla- u 61 chorych cechy zakażenia <i>M. pneumoniae</i> lub <i>Ch. pneumoniae</i> lub obydwoma patogenami	standardowe leczenie + telitromycyna 800mg lub <i>placebo</i> 10 dni	TAK	W grupie leczonej telitromycyną większa poprawa w zakresie objawów klinicznych. Brak różnic w wartościach PEF. Brak zależności pomiędzy obecnością zakażenia a skutecznością leczenia.
Kostadima E. i wsp. [103]	63 chorych na astmę	(-)	klarytromycyna 2x 250mg lub klarytromycyna 3x250mg lub <i>placebo</i> 8 tygodni	TAK	Zmniejszenie nadreaktywności oskrzeli w teście z metacholiną. Brak różnic w wartościach FEV ₁ .
Shoji T. i wsp. [104]	14 chorych na astmę aspirynową (łagodną lub umiarkowaną)	(-)	roksytromycyna 2x150mg lub <i>placebo</i> 8 tygodni	TAK	W grupie leczonej roksytromycyną istotne zmniejszenie eozynofilii, ECP, poprawa kontroli choroby.

Nelson i wsp. [105]	75 chorych na ciężką astmę	(-)	metryloprednizolon+ troleandomycyna 250mg lub <i>placebo</i> 2 lata	NIE	Brak istotnych różnic w zakresie redukcji dawek GKS i kontroli objawów.
Kamada i wsp. [106]	19 chorych na ciężką astmę	(-)	troleandomycyna 250mg + metryloprednizolon lub troleandomycyna 250mg + prednizolon lub <i>placebo</i> + metyloprednizolon	TAK	Między grupami 1 i 3 istotna różnica w zakresie redukcji dawki GKS.
Amayashu i wsp. [107]	17 chorych na astmę epizodyczną	(-)	klarytromycyna 2x200mg lub <i>placebo</i> 8 tygodni	TAK	W grupie leczonej klarytromycyną istotna poprawa kontroli objawów, obniżenie eozynofilii we krwi i w płwocinie, ECP w surowicy i płwocinie. Brak różnic w wynikach testu prowokacji metacholiną.
Garey K. i wsp. [108]	3 chorych z astmą sterydozależną	(-)	klarytromycyna 2x500mg ok. 12 miesięcy	TAK	U 2 chorych możliwe było odstawienie doustnych GKS. U 1 chorego poprawa parametrów spirometrycznych oraz jakości życia.

Tabela I. Wpływ antybiotykoterapii na przebieg astmy

1.8 Uzasadnienie podjęcia badań

Wzrastająca częstość występowania astmy, duża liczba ciężkich przypadków, w których objawy są trudne do opanowania, oraz dotychczasowe doniesienia na temat czynników wpływających na kontrolę objawów skłaniają do podjęcia dalszych badań dotyczących roli *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu choroby. Problem ten nie był dotychczas w Polsce badany na szerszą skalę. Ustalenie roli zakażeń w patogenezie i przebiegu astmy przyczyni się z pewnością do lepszego zrozumienia mechanizmu choroby. Będzie miało także znaczący wpływ na praktyczny aspekt leczenia astmy - umożliwi dobór skuteczniejszej antybiotykoterapii. Jeżeli potwierdzony zostanie wpływ przewlekłej kolonizacji tymi patogenami na wywoływanie bądź zaostrzenie przebiegu choroby, otworzy to drogę do skutecznego leczenia z zastosowaniem eradykacji *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*.

2. CEL PRACY

Celem pracy jest określenie roli zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu astmy.

Cele szczegółowe:

1. Określenie częstości występowania zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* u chorych na astmę.
2. Określenie wpływu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na przebieg i kontrolę astmy (w tym występowanie zaostrzeń).
3. Określenie wartości genetycznej oceny wydzieliny oskrzelowej uzyskanej metodą indukowanej plwociny w rozpoznawaniu zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*.

3. MATERIAŁ

Badaniem objęto 153 dorosłe osoby obojga płci zamieszkujące teren województwa pomorskiego.

Grupę badaną stanowiło 95 chorych na astmę, w tym 64 kobiety i 31 mężczyzn w wieku od 20 do 76 lat (średnia wieku - 47 lat). Badani byli rekrutowani spośród chorych hospitalizowanych w Klinice Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) lub leczonych w przyklinicznej Poradni Alergologicznej. Włączano osoby z pewnym rozpoznaniem przewlekłej astmy, potwierdzonym dodatnią próbą odwracalności obturacji, leczone co najmniej od 6 miesięcy. Kryteriami wyłączenia były: astma epizodyczna, współwystępowanie innych przewlekłych chorób układu oddechowego (POCHP, choroby śródmiąższowe płuc itp.), zaburzenia immunologiczne, choroby nowotworowe, aktualne leczenie immunosupresyjne, marskość wątroby, niewydolność nerek, brak zgody na udział w badaniu.

Grupą kontrolną było 58 zdrowych osób, w tym 39 kobiet i 19 mężczyzn, w wieku od 20 do 80 lat (średnia wieku - 44 lata). Badanych rekrutowano podczas realizacji epidemiologicznego projektu ECAP (*Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce*) oraz wśród pracowników Katedry Pneumonologii i Alergologii GUMed. Stosowano podobne kryteria wyłączenia jak w przypadku grupy badanej, przy czym dodatkowo obejmowały one występowanie w przeszłości lub obecnie wszelkich przewlekłych chorób układu oddechowego lub klinicznie jawnych alergii.

Indukcję płwociny wykonywano wyłącznie w wybranej grupie stabilnych klinicznie chorych na astmę. Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc od pobierania materiału odstępowano w przypadku chorych z wartościami FEV₁ poniżej 70% wartości należnej, saturacji krwi < 90%, niekontrolowanego nadciśnienia tętniczego,

ostrzych incydentów wieńcowych lub udaru mózgu w wywiadzie w ciągu ostatnich 3 miesięcy, tętniaka aorty lub naczyń mózgowych. Wyłączano także kobiety ciężarne.

4. METODY

4.1 Badanie podmiotowe i przedmiotowe

Badanie podmiotowe przeprowadzono z zastosowaniem kwestionariusza skonstruowanego na potrzeby projektu. Uwzględniał on pytania dotyczące m.in. stopnia ciężkości i kontroli astmy, występowania uczuleń, zakażeń układu oddechowego, palenia tytoniu, objawów współistniejących schorzeń oraz przyjmowanych leków (załącznik nr 1). Badanie przedmiotowe wykonywano zgodnie z kwestionariuszem używanym rutynowo w Katedrze Pneumonologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (załącznik nr 2).

4.2 Badanie spirometryczne

Badanie spirometryczne zostało wykonane aparatem Lungtest 1000. Zgodnie ze standardami ERS oceniono następujące parametry: FEV_1 (l), VC (l), FVCEX (l), PEF (l/s), MEF 50 (l/s), MEF 25 (l/s), MEF 25/75 (l/s), $FEV_1\%/FVCEX$ (%), $FEV_1\%/VC$ (%).

4.3 Ocena stopnia ciężkości i stopnia kontroli objawów astmy

Stopień ciężkości, stopień kontroli objawów astmy oraz występowanie zaostrzeń oceniono zgodnie z zaleceniami GINA wykorzystując dane z badania podmiotowego oraz wynik spirometrii (załączniki nr 3,4).

4.4 Punktowe testy skórne z powszechnie występującymi aeroalergenami

Cechy uczulenia na pyłki traw, traw/zbóż, drzew I, drzew II, chwastów, sierść kota i psa, roztocza kurzu domowego (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*), pleśnie I, pleśnie II badano za pomocą punktowych testów skórnych. Zastosowano preparaty firmy *Allergopharma*.

Przed wykonaniem punktowych testów skórnych proszono chorych o odstawienie leków przeciwhistaminowych pierwszej generacji na min. 3 dni, drugiej generacji – min. 7 dni, glikokortykosteroidów stosowanych systemowo (dawka > 10mg w przeliczeniu na prednizolon) – na 6 tygodni, zaś stosowanych miejscowo na skórę przedramion – 3 miesiące.

Standardowe wyciągi alergenowe były nakładane na skórę powierzchni dłoniowej przedramion w odstępach około 4 cm przy zachowaniu odstępu min. 5 cm zarówno od dołu łokciowego jak i nadgarstka. Jako próby dodatniej użyto chlorowodoru histaminy. Kontrolę ujemną stanowił roztwór chlorku sodu. Powierzchnię skóry nakłuwano przez krople roztworów alergenowych i kontrolnych lancetami firmy *Allergopharma*. Dla każdego alergenu używano osobnego lancetu.

Odczyn skóry (średnia średnica bąbla) był oceniany po 15-20 minutach. Jako kryterium reakcji dodatniej przyjęto średnią średnicę bąbla ≥ 3 mm (pole powierzchni bąbla ≥ 7 mm²), po korekcji otrzymanych wyników o wynik kontroli ujemnej.

4.5 Oznaczanie w surowicy przeciwciał przeciwko *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*

Od każdego badanego pobierano 5ml krwi żyłnej na skrzep. U chorych z zaostrzeniem astmy materiał pobierano dwukrotnie – w momencie włączenia do badania oraz 4 tygodnie później. Krew wirowano a uzyskaną surowicę przechowywano w temperaturze - 20°C.

Do oznaczeń obecności w surowicy badanych przeciwciał przeciw *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* użyto zestawów firmy Savyon Diagnostics Ltd. (numery katalogowe: A291-01, A293-01, A192-01, A1261-01M, A1262-01M, A1263-01M). Badanie zostało przeprowadzone za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Stężenie przeciwciał klas G, A badano testem półilościowym, klasy M – jakościowym.

W dniu wykonywania oznaczeń badane surowice rozmrażano i ogrzewano do temperatury pokojowej. Następnie rozcieńczano je w stosunku 1:400 (badanie w kierunku *Chlamydia pneumoniae*) lub 1:105 (badanie w kierunku *Mycoplasma pneumoniae*). 50µl każdej rozcieńczonej surowicy wraz z kontrolą dodatnią, kontrolą ujemną oraz kalibratorami wprowadzano na płytkę reakcyjną (w przypadku testu jakościowego zamiast kalibratorów stosowano roztwór *cut-off*). Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C płynna zawartość dołków reakcyjnych była usuwana. Trzykrotnie płukano je roztworem buforującym (300µl). Następnie wprowadzano do nich 50µg koniugatu przeciwciał skierowanych przeciw oznaczanym immunoglobulinom. Inkubowano godzinę w temperaturze 37°C, po czym usuwano zawartość dołków i ponownie trzykrotnie płukano buforem. Do każdego dołka dodawano 100µl substratu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Reakcję zatrzymywano dodaniem 100µl 1M roztworu H₂SO₄. Za pomocą spektrofotometru mierzono absorpcję światła o długości fal 450/620nm i obliczano stężenie przeciwciał w badanych surowicach.

Zgodnie z zaleceniami producenta wynik badania na obecność przeciwciał klas G, A przeciw *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* uznawano za dodatni przy stężeniu przynajmniej 10BU/ml. W odniesieniu do przeciwciał klasy M za kryterium dodatniego testu przyjęto wartość indeksu *cut-off* powyżej 1,5 (*Chlamydia pneumoniae*) lub 11 (*Mycoplasma pneumoniae*). U chorych z zaostrzeniem astmy, u których pierwsze oznaczenie IgM było negatywne, wykonywano powtórne badanie z użyciem materiału pobranego 4 tygodnie później.

Badanie umożliwiło wyróżnienie grup chorych z przebyłym, aktualnym ostrym i przewlekłym zakażeniem.

4.6 Oznaczanie obecności materiału genetycznego *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w wydzielinie dróg oddechowych

4.6.1 Indukcja płwociny

Przed badaniem stosowano premedykację lekiem bronchodylatacyjnym (400µg salbutamolu MDI) oraz wykonywano spirometrię. Następnie chorzy otrzymywali nebulizację z roztworem 5% chlorku sodu w trzech cyklach trwających 5 minut. Używano nebulizatora ultradźwiękowego Easy Neb II firmy *Flaemnuova*. Po każdej inhalacji proszono o odkrztuszenie płwociny do sterylnego pojemnika. Pomiędzy kolejnymi cyklami wykonywano kontrolne badania spirometryczne.

Badanie przerywano w razie wystąpienia napadu duszności, kaszlu, świszczącego oddechu lub w przypadku obniżenia wartości FEV₁ o ponad 20% w porównaniu z badaniem wykonanym przed indukcją.

Uzyskany materiał przechowywano w temperaturze - 70°C.

4.6.2 Izolacja DNA

Do izolacji DNA z płwociny użyto zestawu „Swab” firmy *A&A Biotechnology* (numer katalogowy 025-25).

Do próbki z pobranym, rozmrożonym materiałem dodawano 0,7 ml roztworu lizującego oraz 20µl proteinazy K. Po wymieszaniu i dwudziestominutowej inkubacji w temperaturze 37°C pobierano roztwór z próbki i наносono na kolumnę do oczyszczania DNA. Wirowano przez 1 minutę przy 10-15 tys. RPM. Dwukrotnie dolewano 0,5 ml roztworu płuczającego A1 i wirowano przez 1 minutę przy 10-15 tys. RPM. Osuszoną minikolumnę umieszczano w nowej próbce, dodawano 150µl ogrzanego do 75°C buforu elucyjnego i inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej. Ponownie wirowano a uzyskane oczyszczone DNA przechowywano w lodówce do czasu wykonania kolejnego etapu badania.

4.6.3 Oznaczenie obecności DNA *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* techniką PCR

Wykrycie materiału genetycznego *Chlamydia pneumoniae* było oparte na amplifikacji fragmentu genu *ompA* (ang. *outer membrane protein*) w układzie nested-PCR. Badanie polegało na przeprowadzeniu dwóch kolejnych reakcji PCR.

W pierwszej reakcji wykorzystano jedną parę starterów. Mieszaniny reakcyjne składały się z polimerazy termostabilnej *Taq* (1,5µl), mieszaniny deoksynukleotydów (5,0µl), badanego DNA (3,0µl) oraz MasterMix PCR-OUT (42,5µl). Do mieszaniny reakcyjnej kontroli pozytywnej zamiast badanego materiału dodawano 2µg DNA *Chlamydia pneumoniae*, natomiast do mieszaniny kontroli negatywnej – równoważną objętość buforu

TE (10mM Tris-Cl pH 8,0 1mM EDTA). Amplifikację prowadzono przy użyciu termocyklera Mastercycler Gradient firmy *Eppendorf*. Po 5 minutach wstępnej denaturacji DNA w temperaturze 94°C prowadzono 40 cykli kolejnych denaturacji (30s, 94°C), dołączania starterów (2 min., 58°C) oraz elongacji DNA (30s, 72°C). Amplifikację kończono pięciominutowym okresem wydłużania końcowego w temperaturze 72°C. Detekcję produktów prowadzono z zastosowaniem markera M1 (DNA Gdańsk) elektroforezą na żelu agarozowym. W razie wykrycia produktu test interpretowano jako dodatni. W przypadku wyniku negatywnego przeprowadzano reamplifikację. Powstały w pierwszym etapie produkt o wielkości 424 par zasad stanowił zatem matrycę w kolejnej reakcji, w której stosowana była druga para starterów komplementarnych do miejsc wewnątrz produktu. Mieszaniny reakcyjne przygotowywano podobnie jak w przypadku reakcji wstępnej, używając uzyskanych podczas niej produktów (2µl). Amplifikacja obejmowała 40 cykli kolejnych denaturacji (30s, 94°C), dołączania starterów (90s, 58°C) oraz elongacji DNA (30s, 72°C). Kończono ją pięciominutowym okresem wydłużania końcowego w temperaturze 72°C. W wyniku pozytywnej reakcji powstał produkt złożony z 147 par zasad, który był widoczny na żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Uzyskane wyniki analizowano i archiwizowano przy użyciu programu komputerowego FOTOAnalyst firmy *Fotodyne*.

Wykorzystano zestaw firmy *DNA-Gdańsk II* (nr katalogowy: PK 16).

Wykrywanie materiału genetycznego *Mycoplasma pneumoniae* było oparte na amplifikacji fragmentu genu 16s rDNA. Mieszaniny reakcyjne składały się z polimerazy termostabilnej *Hypernova* (0,5µl), mieszaniny deoksynukleotydów (5,0µl), badanego DNA (2,0µl) oraz MasterMix (42,5µl). Do mieszaniny reakcyjnej kontroli pozytywnej zamiast badanego materiału dodawano DNA *Mycoplasma pneumoniae*, natomiast do mieszaniny kontroli negatywnej – równoważną objętość buforu TE. Amplifikację prowadzono przy

użyciu termocyklera Mastercycler Gradient firmy *Eppendorf*. Po 4 minutach wstępnej denaturacji DNA w temperaturze 94°C prowadzono 40 cykli kolejnych denaturacji (60s, 94°C), dołączania starterów (40s, 58°C) oraz elongacji DNA (30s, 72°C). Amplifikację kończono czterominutowym okresem wydłużania końcowego w temperaturze 72°C. Detekcję produktów prowadzono z zastosowaniem markera M100-500 (*DNA Gdańsk II*) elektroforezą na żelu agarozowym. W razie wykrycia produktu o wielkości 277 par zasad test interpretowano jako pozytywny. Uzyskane wyniki analizowano i archiwizowano przy użyciu programu komputerowego FOTOAnalyst firmy *Fotodyne*. Do badania wykorzystano zestaw firmy *DNA-Gdańsk II* sporządzony na zamówienie.

Badanie umożliwiło rozpoznanie kolonizacji dróg oddechowych przez wymienione drobnoustroje.

4.7 Analiza statystyczna

Za pomocą analiz statystycznych oceniano:

- różnice w częstości występowania zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* u chorych na astmę i osób zdrowych;
- różnice w częstości występowania zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* u chorych na astmę o różnym stopniu ciężkości i różnym stopniu kontroli objawów;
- różnice w częstości występowania zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* u chorych na astmę atopową i nieatopową.

Do badania zależności pomiędzy zmiennymi jakościowymi (częstość występowania zakażeń w różnych grupach) wykorzystano test nieparametryczny chi-kwadrat (χ^2). Nie

wymaga on od badacza sformułowania założeń o normalności rozkładu czy jednorodności wariancji, a zatem nadaje się do analizowania wyników uzyskanych dzięki pomiarom zmiennych nominalnych i porządkowych. Poziom istotności p mniejszy lub równy 0,05 oznacza, że istnieją podstawy do odrzucenia hipotezy zerowej, która głosi, że badane zmienne są od siebie niezależne.

Analizy zostały przeprowadzone przy użyciu pakietów statystycznych Statistica 6.0 i SPSS.

Praca uzyskała zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (decyzja NKEBN 741/2005 z dnia 20 grudnia 2005r.).

5. WYNIKI

5.1 Charakterystyka badanych populacji (wyniki badania kwestionariuszowego)

Spośród 95 chorych na astmę włączonych do badania u 15 (15,8%) początek dolegliwości był związany z objawami zakażenia dróg oddechowych. U 52 chorych (54,7%) objawy takie towarzyszyły w przeszłości zaostrzeniom astmy. U żadnego badanego nie wykonywano jednak wcześniej badań diagnostycznych w kierunku zakażenia *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae*.

Najczęstszą alergiczną chorobą współistniejącą z astmą był alergiczny nieżyt nosa (70,5%). Rzadziej rozpoznawano alergię pokarmową (29,5%), pokrzywkę (19%), atopowe zapalenie skóry (8,4%), alergię na leki (13,7%), alergię na jady owadów błonkoskrzydłych (6,3%).

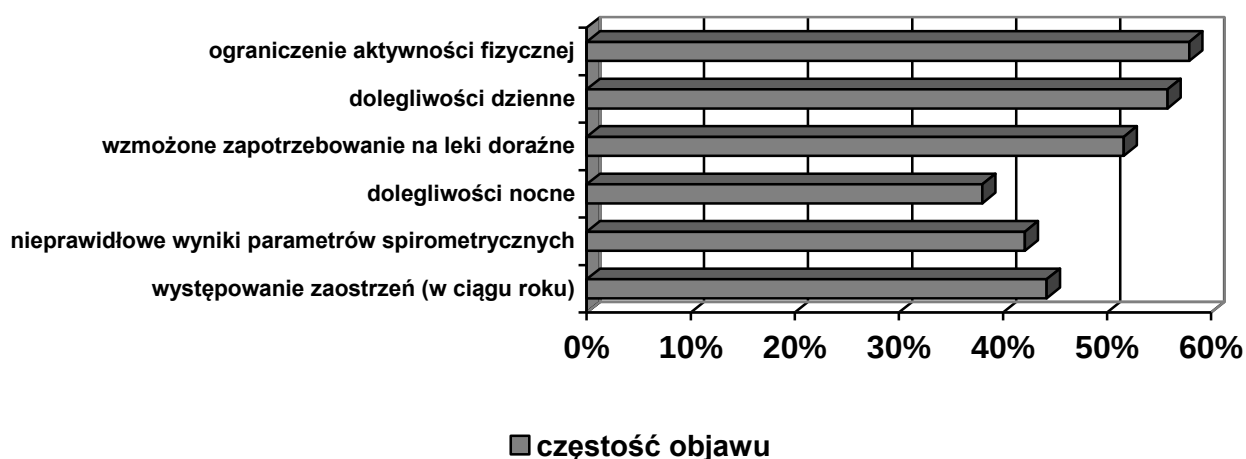
Porównanie grupy badanej i kontrolnej pod względem występowania chorób przewlekłych przedstawiono w tabeli II.

Choroba	Częstość występowania	
	Chorzy na astmę	Grupa kontrolna
nadciśnienie tętnicze	24 (25,2%)	8 (13,8%)
cukrzyca	9 (9,5%)	2 (3,4%)
choroba wieńcowa	2 (2,1%)	1 (1,7%)
jaskra	3 (3,1%)	0 (0%)
osteoporoza	8 (8,4%)	2 (3,4%)
zespół uzależnienia od tytoniu	6 (6,3%)	15 (25,8%)

Tabela II. Występowanie chorób przewlekłych w badanych grupach

5.2 Stopień kontroli oraz ciężkości astmy w badanej grupie

Spośród 95 chorych na astmę włączonych do badania u 25 (26,3%) stwierdzono dobrą kontrolę, u 23 (24,2%) – częściową kontrolę zaś u 47 (49,5%) – brak kontroli objawów choroby. Najczęściej nie spełnianymi kryteriami kontroli objawów były: brak ograniczeń aktywności fizycznej (kryterium niespełnione u 57,9% chorych) oraz brak objawów dziennych (55,8%). U 36 chorych rozpoznano aktualne zaostrzenie astmy zaś u kolejnych 6 przynajmniej jedno zaostrzenie wystąpiło w czasie minionego roku (rycina 1).

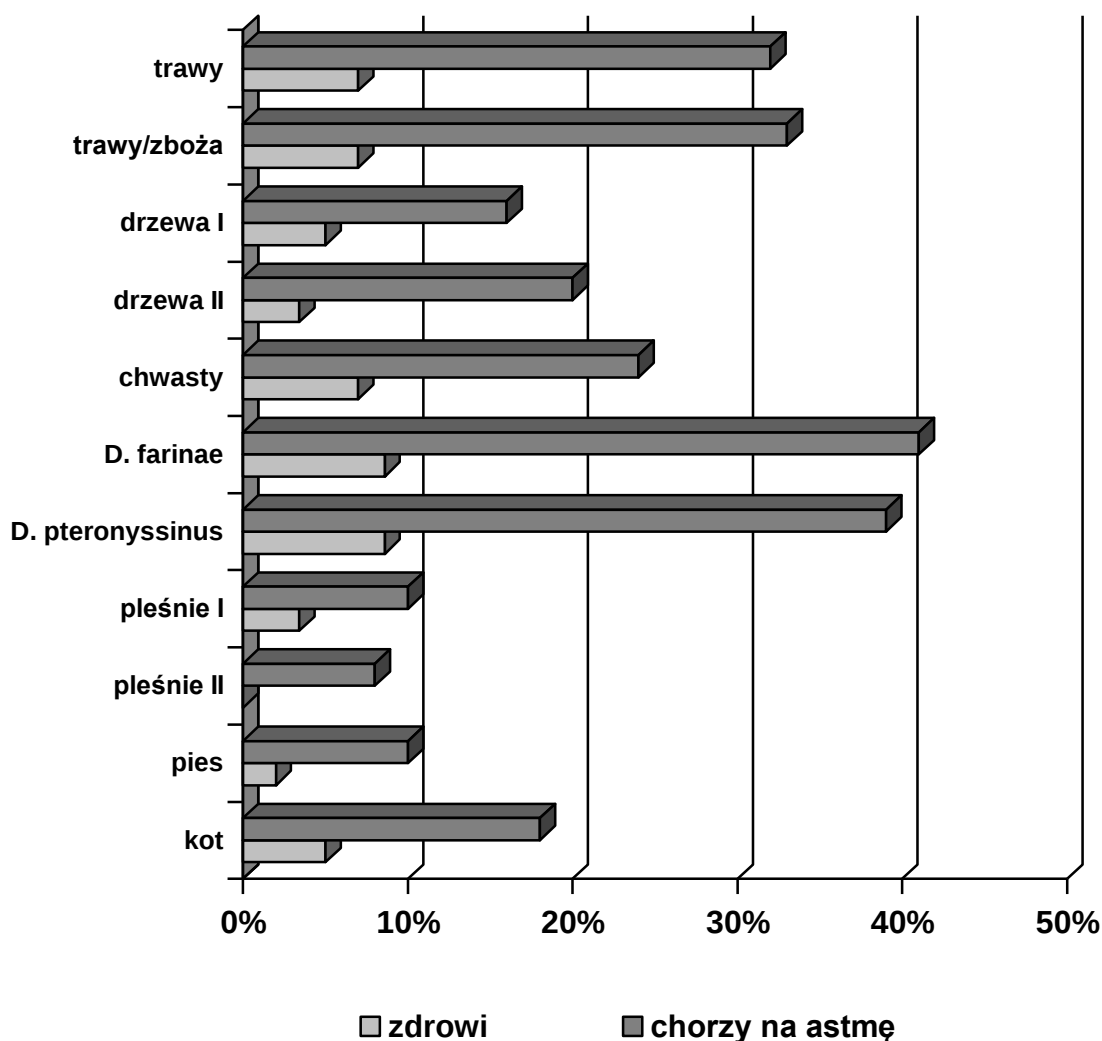


Rycina 1. Częstość występowania kryteriów braku kontroli astmy w badanej grupie

U 24 (25,3%) chorych na astmę rozpoznano lekką postać choroby, u 38 (40%) – umiarkowaną, zaś u 33 (34,7%) – ciężką postać.

5.3 Częstość występowania alergii

Przynajmniej jeden wynik dodatni testu skórniego stwierdzono u 51 chorych na astmę (53,7%) oraz u 7 osób zdrowych (12,1%). Najczęściej uzyskiwano dodatnie wyniki z alergenami roztoczy kurzu domowego oraz pyłków traw (rycina 2).



Rycina 2. Częstość występowania uczuleń wśród chorych na astmę i osób zdrowych

5.4 Częstość występowania serologicznych cech zakażenia *Chlamydia pneumoniae*

U 64 (67,4%) chorych na astmę oraz u 24 (41,3%) osób zdrowych stwierdzono obecność przynajmniej jednej klasy przeciwciał przeciw *Chlamydia pneumoniae*.

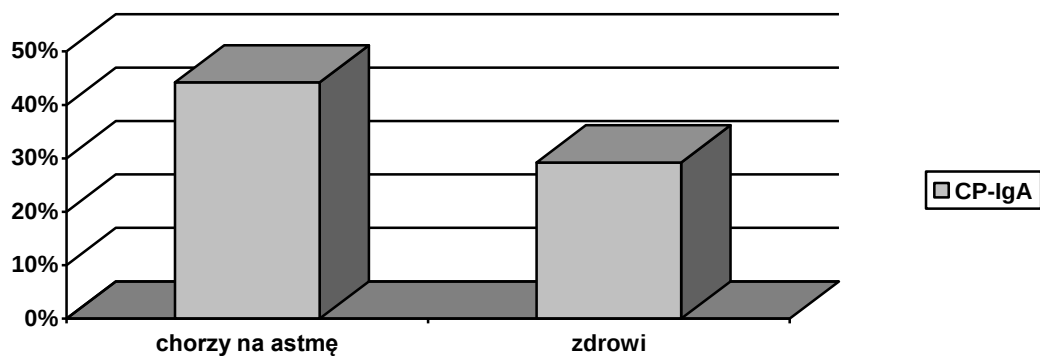
Przeciwciała klasy M były obecne w surowicy 16 badanych, w tym 11 chorych na astmę (11,6%) oraz 5 osób zdrowych (8,6%). W grupie kontrolnej w chwili pobierania materiału u nikogo nie stwierdzano klinicznych objawów zakażenia dróg oddechowych.

Spośród chorych na astmę z dodatnimi wynikami u 4 rozpoznano zaostrzenie, zaś u 7 – dolegliwości miały stabilny charakter. (U 5 osób objawy astmy były kontrolowane częściowo, u 2 – były niekontrolowane.) Przy uwzględnieniu podziału w zależności od stopnia ciężkości choroby cechy zakażenia stwierdzono u 2 (8,3%) chorych na lekką astmę, u 5 (15,2%) na umiarkowaną astmę oraz u 4 (12,9%) na ciężką astmę. Obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

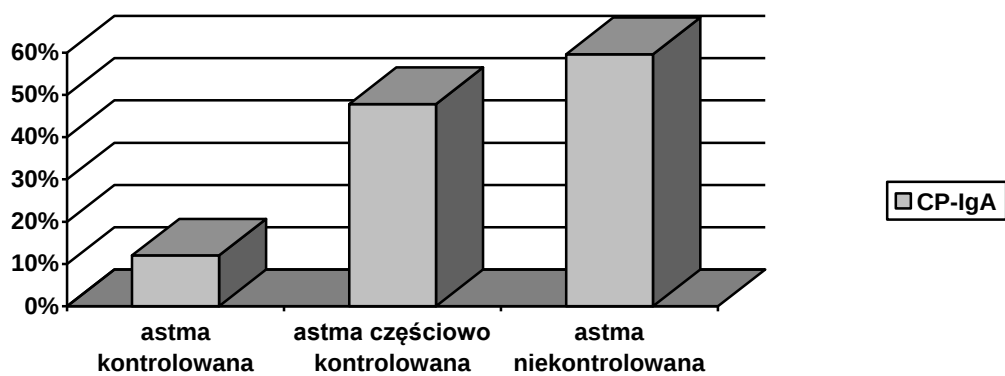
Obecność przeciwciał klasy A przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 59 osób, w tym u 42 (44,2%) chorych na astmę oraz u 17 (29,3%) zdrowych ($p < 0,05$). W grupie chorych IgA występowały u 3 osób (12%) z pełną kontrolą objawów, u 11 osób (47,8%) z częściową kontrolą oraz u 28 (59,6%) z niekontrolowaną astmą. Różnice między grupami były istotne statystycznie ($p < 0,001$). Różnic takich nie stwierdzono natomiast stosując podział chorych w zależności od stopnia ciężkości astmy. Obecność IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono wówczas u 7 chorych (29,2%) z lekką postacią choroby, 22 (57,9%) z postacią umiarkowaną oraz 13 (40,6%) z postacią ciężką ($p = 0,07$) (rycina 3).

Przeciwciała klasy G wykryto u 79 badanych, w tym u 58 chorych (61%) oraz 21 (36,2%) osób zdrowych ($p < 0,05$). Wyniki dodatnie występowały znamienne częściej wśród chorych z objawami niekontrolowanymi (70,2%) w porównaniu z tymi, u których osiągnięto dobrą kontrolę (40%) ($p < 0,05$). Różnicy takiej nie stwierdzono natomiast pomiędzy grupami o odmiennych stopniach ciężkości choroby ($p = 0,129$) (rycina 4).

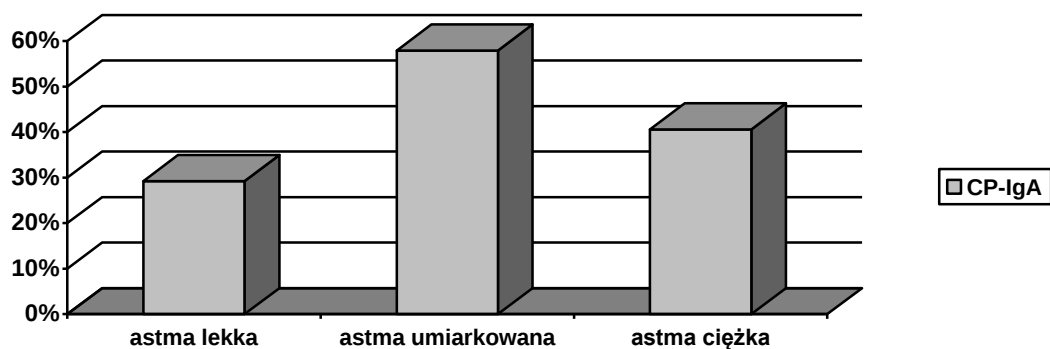
a)



b)

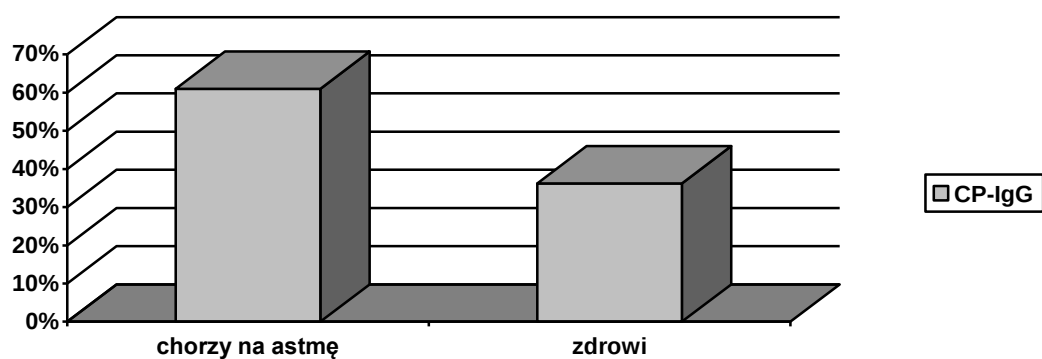


c)

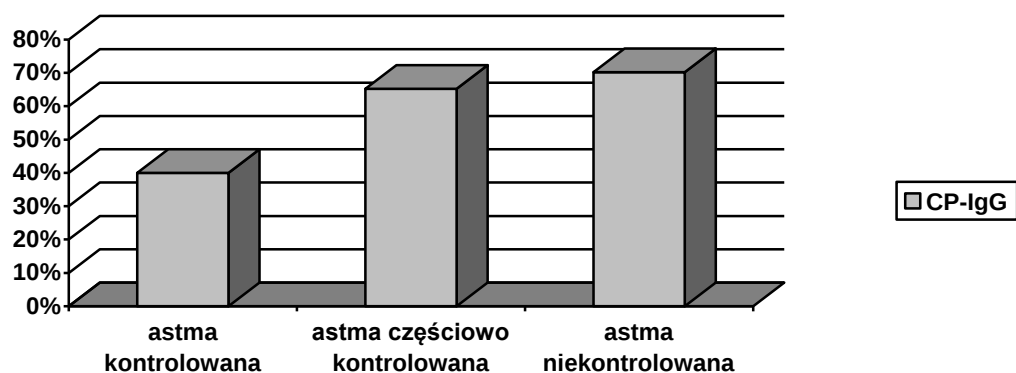


Rycina 3. Częstość występowania IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae*: a) u osób zdrowych i chorych na astmę, b) u chorych na astmę – z uwzględnieniem stopnia kontroli choroby, c) u chorych na astmę – z uwzględnieniem stopnia ciężkości choroby

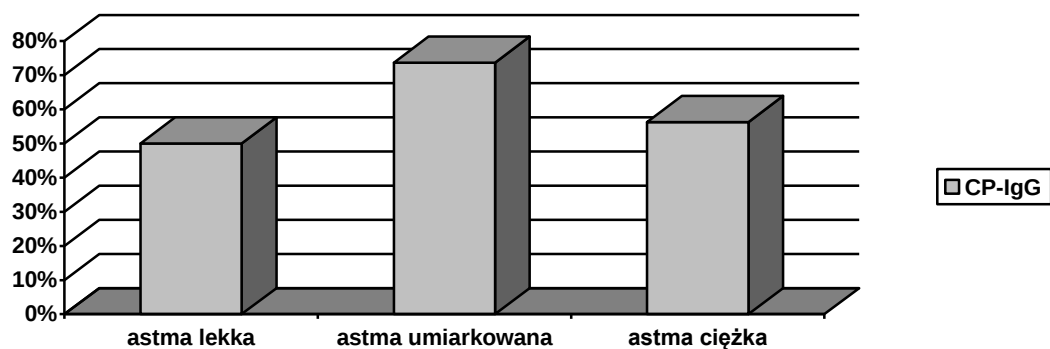
a)



b)



c)



Rycina 4. Częstość występowania IgG przeciw *Chlamydia pneumoniae*: a) u osób zdrowych i chorych na astmę, b) u chorych na astmę – z uwzględnieniem stopnia kontroli choroby, c) u chorych na astmę – z uwzględnieniem stopnia ciężkości choroby

5.5 Częstość występowania serologicznych cech zakażenia *Mycoplasma pneumoniae*

U 21 (22,1%) chorych na astmę oraz 16 (27,6%) osób zdrowych stwierdzono obecność przynajmniej jednej klasy przeciwciał przeciw *Mycoplasma pneumoniae*.

Przeciwciała klasy M były obecne w surowicy 9 badanych, w tym 6 chorych na astmę (6,3%) oraz 3 osób zdrowych (5,3%). W grupie kontrolnej w chwili pobierania materiału u nikogo nie stwierdzano klinicznych objawów zakażenia dróg oddechowych. Spośród chorych na astmę z pozytywnymi wynikami u 4 rozpoznano zaostrzenie, zaś u 2 – dolegliwości miały stabilny charakter.

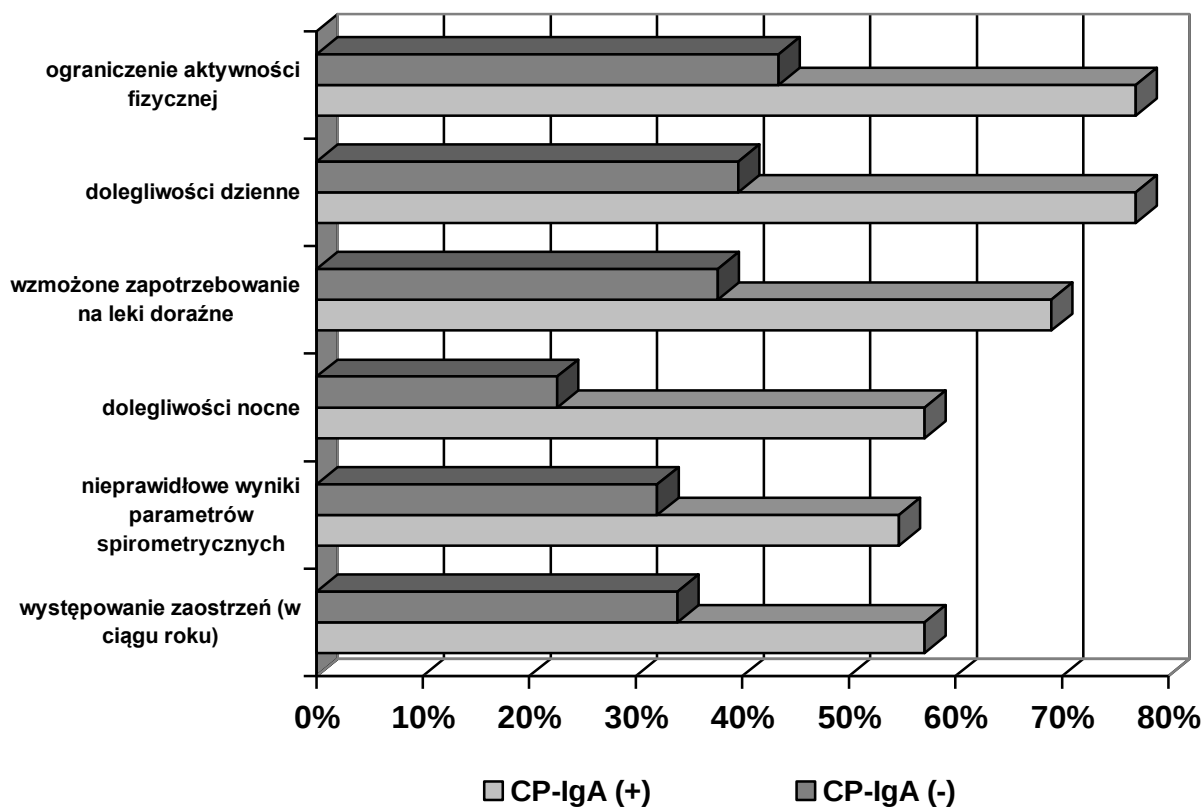
Obecność przeciwciał klasy A przeciw *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono u 10 badanych, w tym u 6 (6,3%) chorych na astmę oraz u 4 (6,9%) zdrowych. W grupie chorych IgA występowały u 1 osoby z pełną kontrolą objawów, u 4 osób z częściową kontrolą oraz u 1 osoby z niekontrolowaną astmą. Przy podziale chorych według ciężkości astmy obecność IgA przeciw *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono u 1 chorego z lekką postacią choroby, u 4 chorych - z postacią umiarkowaną oraz jednego - z postacią ciężką. Mała liczebność grup uniemożliwiła przeprowadzenie analizy statystycznej

Przeciwciała klasy G wykryto u 25 badanych, w tym u 13 chorych (13,7%) oraz 12 (20,7%) osób zdrowych. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy chorymi na astmę niekontrolowaną (5,2%), częściowo kontrolowaną (4,2%) oraz kontrolowaną (4,2%) ($p=0,68$) oraz pomiędzy grupami o odmiennych stopniach ciężkości choroby (astma lekka – 4,2%, umiarkowana – 3,1%, ciężka – 6,3% ($p=0,38$)).

5.6 Wpływ zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na poszczególne kryteria kontroli astmy

U chorych, u których stwierdzono w surowicy obecność IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae*, częściej występowały wszystkie cechy braku kontroli objawów astmy (rycina

5). Ze względu na niewielką liczebność grupy nie udało się przeprowadzić podobnej analizy w odniesieniu do zakażeń *Mycoplasma pneumoniae*.



Rycina 5. Częstość występowania kryteriów braku kontroli astmy w zależności od obecności przeciwciał klasy A przeciw *Chlamydia pneumoniae*

5.7 Kolonizacja dróg oddechowych przez *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*

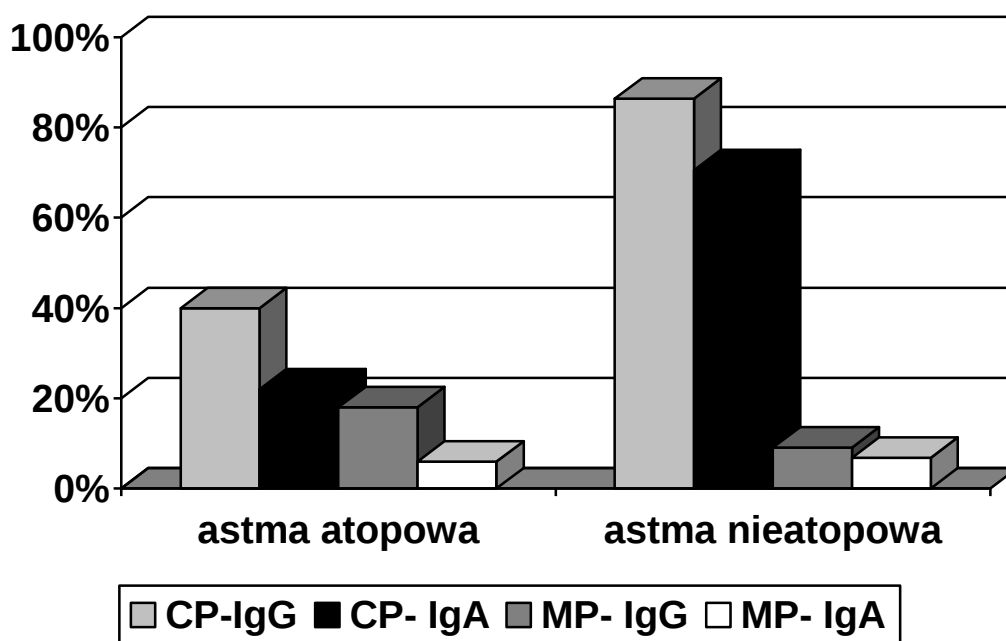
Oznaczenie obecności materiału genetycznego *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* wykonano w grupie 20 chorych na astmę. Wyniki dodatnie uzyskano u 9 badanych (*Chlamydia pneumoniae* – 7 osób, *Mycoplasma pneumoniae* – 1 osoba, obydwa patogeny – 1 osoba).

Spośród 8 chorych, u których stwierdzono kolonizację *Chlamydia pneumoniae*, u 7 wykryto również w surowicy IgA przeciw temu patogenowi. U kolejnych dwóch badanych z serologicznymi cechami przewlekłego zakażenia nie stwierdzono badaniem PCR obecności *Chlamydia pneumoniae*.

U obydwu chorych skolonizowanych przez *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono również obecność swoistych IgA w surowicy. U jednej osoby nie stwierdzono obecności patogenu w indukowanej płwocinie pomimo pozytywnego wyniku badania serologicznego.

5.8 Zakażenie *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae* a alergia

Obecność przeciwciał klas G i A przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzano istotnie częściej wśród chorych na astmę nieatopową ($p < 0,05$). Różnice takie nie występowały w zakresie serologicznych cech zakażenia *Mycoplasma pneumoniae* (rycina 6).



Rycina 6. Występowanie serologicznych cech zakażenia *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* u chorych na astmę atopową i nieatopową

6. DYSKUSJA

W niniejszym badaniu określono wpływ zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na przebieg astmy. Oceniono 95 chorych na astmę (w tym 64 kobiety i 31 mężczyzn) oraz 58 osób zdrowych. Istotna dysproporcja w zakresie płci badanych odzwierciedla tendencję typową dla astmy. Choroba ta w populacji dziecięcej jest zazwyczaj częściej rozpoznawana u chłopców, zaś wśród dorosłych – u kobiet. Wśród osób z ciężką astmą liczebna przewaga kobiet jest szczególnie zaznaczona [109-111].

W celu zróżnicowania astmy atopowej i nieatopowej zebrano wywiad alergologiczny oraz wykonano punktowe testy skórne z powszechnie występującymi aeroalergenami. Przynajmniej jeden pozytywny wynik testu stwierdzono u 51 (53,7%) chorych. Proporcje te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, w których odsetek astmy atopowej szacowano na 30-60% w zależności od przyjętej definicji astmy i atopii [112,113]. Najbardziej istotnymi klinicznie alergenami wśród chorych były roztocza kurzu domowego oraz pyłki traw. Ich znaczenie w przebiegu chorób alergicznych wykazano również w badaniu epidemiologicznym ECAP [114].

Pomimo negatywnego wywiadu u 7 osób (12,1%) z grupy kontrolnej stwierdzono w punktowych testach skórnych cechy uczulenia na przynajmniej jeden alergen. Można to tłumaczyć występowaniem tzw. klinicznie niemych uczuleń. W takich sytuacjach, pomimo obecności swoistych IgE w surowicy, nie dochodzi do rozwoju reakcji alergicznej.

Uwagę zwraca duża liczba chorych, u których stwierdzono brak kontroli objawów astmy (49,5%) bądź tylko częściową ich kontrolę (24,2%). Te niepokojące wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia wskazujące, że pomimo włączania leczenia zgodnego z aktualnymi wytycznymi objawy astmy utrzymują się u ok. 50% chorych [115,116]. W niniejszym badaniu nie bez znaczenia pozostaje również miejsce rekrutacji

chorych. Pod opieką ośrodków akademickich znajduje się z pewnością więcej chorych na astmę ciężką, źle kontrolowaną niż w placówkach o niższym stopniu referencyjności.

Problem zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* rozpatrywano w dwóch aspektach. Po pierwsze, badano ich rolę w zaostrzeniach astmy. Po drugie, określano ich wpływ na ciężkość i stopień kontroli astmy wśród wszystkich chorych. Dodatkowo porównano częstość przebytych i aktualnych zakażeń pomiędzy chorymi i grupą kontrolną. W tych celach oznaczono w surowicach badanych stężenie przeciwciał klas G, M, A przeciw *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*. Zastosowano test immunoenzymatyczny. Metodę tę wybrano ze względu na zadowalającą czułość i swoistość a także powszechną dostępność, która w przyszłości umożliwi praktyczne wykorzystanie wyników badania. Dodatkowo u wybranej grupy chorych badano obecność wymienionych patogenów w wydzielinie dróg oddechowych pozyskanej metodą tzw. indukowanej płwociny. Metoda ta, choć pozwala na nieinwazyjne uzyskanie materiału, jest obciążona istotnymi wadami. Ze względu na ryzyko wywołania skurczu oskrzeli przez stężony chlorek sodu, nie należy jej stosować m.in. w niestabilnej fazie choroby, gdy wartości FEV₁ nie przekraczają 70% wartości należnej. Wyłączenie z badania tej grupy chorych, u których zakażenie dróg oddechowych jest najbardziej prawdopodobne, mogło istotnie zaniżyć uzyskane wyniki.

Częstość zakażeń porównywano pomiędzy grupami różniącymi się ciężkością oraz stopniem kontroli astmy. Zalecenie oceniania stopnia kontroli, odpowiadającego opanowaniu objawów choroby, zostało wprowadzone do wytycznych GINA w 2006 roku, a więc w trakcie realizacji projektu. Dlatego zastosowano podwójne grupowanie chorych - zarówno według starej klasyfikacji, opartej na ciężkości astmy jak i nowej - uwzględniającej stopień kontroli. Niniejsze badanie jest pierwszym uwzględniającym dwie

klasyfikacje. Dostępne dotychczas publikacje oparte były w większości na ocenie ciężkości astmy.

Podwójne oznaczenie IgM umożliwiło określenie czynnika etiologicznego infekcyjnego zaostrzenia astmy u 8 chorych (22,2%). U 4 spośród nich była to *Chlamydia pneumoniae*, zaś 4 pozostałych – *Mycoplasma pneumoniae*. Wyniki te wskazują na istotną rolę atypowych bakterii w inicjowaniu zaostrzeń astmy potwierdzając wcześniejsze doniesienia na ten temat. W badaniu Cunninghama i wsp. *Chlamydia pneumoniae* została zidentyfikowana jako czynnik etiologiczny w 23%, zaś *Mycoplasma pneumoniae* – w 1% epizodów zaostrzeń w badanej populacji dziecięcej [70]. Wśród dorosłych z zaostrzeniem astmy Wark i wsp. ocenili testem ELISA częstość występowania serologicznych wykładników „świeżego” zakażenia *Chlamydia pneumoniae* na 38% [66]. Natomiast w pracach Lieberman i wsp. oraz Allegra i wsp. opartych na technice immunofluorescencji tę częstość określono dla *Chlamydia pneumoniae* – odpowiednio na 8% i 9% zaś dla *Mycoplasma pneumoniae* – 18% i 2% [65, 67]. Rozbieżności w cytowanych pracach można tłumaczyć różnicami w doborze chorych i wykonywaniu oznaczeń. Nie bez znaczenia pozostaje też okres rekrutacji. Jeżeli nie obejmuje on pory epidemicznych zakażeń, uzyskane wyniki mogą być zaniżone.

Z kolei w badaniu Cook i wsp. częstość zakażeń *Chlamydia pneumoniae* była w grupie chorych hospitalizowanych z powodu zaostrzenia astmy taka sama jak wśród osób zdrowych [68]. Z jednej strony może to przeczyć podejrzeniom o roli zakażeń atypowymi patogenami w indukcji zaostrzeń astmy. Z drugiej strony pozwala przypuszczać, że ten powszechny rodzaj zakażeń jest częściej bezobjawowy u osób zdrowych, natomiast u chorych na astmę prowadzi do zaostrzenia dolegliwości.

Drugim aspektem wpływu *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* na przebieg astmy rozpatrywanym w niniejszej pracy była rola przewlekłego zakażenia.

W tym celu oznaczono w surowicy badanych swoiste IgA, a dodatkowo u wybranych chorych, obecność patogenów w wydzielinie dróg oddechowych. IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 44,2% chorych na astmę i 29,3% osób zdrowych, natomiast kolonizację dróg oddechowych – u 8 chorych.

Serologiczne cechy przewlekłego zakażenia występowały istotnie częściej u chorych z gorszą kontrolą objawów. Nie stwierdzono natomiast znamiennych różnic pomiędzy grupami różniącymi się ciężkością choroby. Uzyskane wyniki w większości potwierdzają wcześniejsze doniesienia dotyczące korelacji pomiędzy dawkami przyjmowanych steroidów, liczbą zaostrzeń, występowaniem zaburzeń wentylacji a obecnością IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae* [75, 70]. Z drugiej strony badanie nie potwierdza różnic w częstości występowania IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae* pomiędzy chorymi o różnym stopniu ciężkości choroby, co wcześniej było opisywane przez niektórych badaczy [76]. Można to jednak tłumaczyć lepszym odzwierciedleniem rzeczywistego stanu chorych przez nową klasyfikację, opartą na kontroli objawów.

O ile uzyskane w badaniu wyniki dotyczące zakażeń *Chlamydia pneumoniae* łatwo odnieść do podobnych prac prowadzonych wcześniej, o tyle wpływ *Mycoplasma pneumoniae* na kontrolę astmy nie został do tej pory jednoznacznie określony. W prezentowanym badaniu obecność IgA przeciw *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono u zaledwie 10 osób, w tym u 6 (6,3%) chorych na astmę oraz u 4 (6,9%) zdrowych, natomiast kolonizację dróg oddechowych u 2 spośród 20 badanych. Niską częstość występowania zakażeń można tłumaczyć przeprowadzeniem rekrutacji do badania w okresie rzadkich zachorowań. Mają one zazwyczaj charakter sezonowy a epidemie występują co kilka lat. Ponadto w nielicznych badaniach dotyczących częstości występowania serologicznych cech przewlekłego zakażenia *Mycoplasma pneumoniae* nie stwierdzano różnic pomiędzy chorymi na astmę a osobami zdrowymi [117].

Jednym z pytań postawionych w prezentowanej pracy była przydatność badania kolonizacji atypowymi bakteriami przy pomocy techniki PCR. Kolonizację *Chlamydia pneumoniae* wykryto u 8 chorych, przy czym u 7 z nich wykryto również w surowicy IgA przeciw temu patogenowi. U kolejnych dwóch badanych z serologicznymi cechami przewlekłego zakażenia nie stwierdzono natomiast badaniem PCR obecności *Chlamydia pneumoniae*. Kolonizację przez *Mycoplasma pneumoniae* potwierdzono u 2 chorych, u których jednocześnie stwierdzono obecność swoistych IgA w surowicy. U jednej osoby wynik badania molekularnego był negatywny pomimo obecności IgA. Wyniki te, choć uzyskane na małej grupie badanych, są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami. Technika PCR, pomimo znacznie wyższej czułości w porównaniu z stosowanymi wcześniej metodami hodowlanymi, zazwyczaj nie pozwala na uzyskanie wyników korelujących dobrze z badaniami serologicznymi [118]. Na przykład w badaniu Myashita i wsp. obejmującym 168 chorych z zaostrzeniem astmy, kolonizację *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono metodami hodowlanymi – u 1,2%, badaniem serologicznym – u 8,9%, techniką PCR – u 5,4% badanych [69]. Z kolei w pracy Verkooyen i wsp. spośród 156 chorych na zapalenie płuc u 14% stwierdzono cechy zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w badaniu PCR pomimo negatywnego wyniku diagnostyki serologicznej, u 9% - negatywny wynik PCR przy pozytywnym wyniku badania serologicznego, a zaledwie u 6% badanych - pozytywne wyniki uzyskano dwiema technikami [119].

Osobnego omówienia wymaga problem występowania serologicznych wykładników przebytego w przeszłości zakażenia patogenami atypowymi. Ponieważ *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* należą do częstych czynników etiologicznych wywołujących zakażenia dróg oddechowych, cechy przebytego zakażenia są z reguły stwierdzane w dużej części populacji. W niniejszym badaniu obecność IgG przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 61% chorych na astmę i 36,2% zdrowych.

W odniesieniu do *Mycoplasma pneumoniae* częstość wynosiła odpowiednio 13,7% oraz 20,7%.

Na przestrzeni minionych kilkunastu lat wielokrotnie badano możliwy związek zakażeń atypowymi bakteriami z rozwojem astmy. Z jednej strony, podobnie jak w niniejszym badaniu, obserwowano bowiem częstsze występowanie cech przebytego zakażenia u chorych na astmę w porównaniu z osobami zdrowymi oraz częstszą kolonizację dróg oddechowych, z drugiej – opisywano rozwój astmy *de novo* po przebyciu ostrego zakażenia. Przegląd publikacji dotyczących związku zakażeń z rozwojem astmy zamieszczono w tabeli III. Obecność IgG przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzano w cytowanych badaniach u 11-82% osób zdrowych oraz 28-92% chorych na astmę.

Do niniejszego badania włączano wyłącznie chorych leczonych z powodu astmy przynajmniej od 6 miesięcy. Niemożliwe było zatem określenie częstości zakażeń w przypadkach „świeżo” wykrytych. Niemniej jednak potwierdzono znamienne częstsze występowanie IgG przeciw *Chlamydia pneumoniae* wśród chorych na astmę w porównaniu z osobami zdrowymi oraz w grupie z niekontrolowanymi objawami choroby w porównaniu z grupą z dobrą kontrolą objawów. Różnic takich nie stwierdzono w przypadku IgG przeciw *Mycoplasma pneumoniae*.

Uzyskane wyniki wydają się zatem potwierdzać wcześniejsze podejrzenia badaczy dotyczące roli *Chlamydia pneumoniae* w indukcji procesu zapalnego. Z drugiej strony nie można pominąć faktu, iż astma jako przewlekła choroba zapalna stanowi czynnik predysponujący do zakażeń dróg oddechowych. Nie sposób zatem jednoznacznie rozstrzygnąć, czy stwierdzane w niniejszym badaniu zakażenia były przyczyną czy też konsekwencją nieopanowanego należycie procesu zapalnego.

Publikacja	Liczebność badanych	Stosowane metody	Związek z astmą? Wyniki
von Hertzen i wsp. [61]	332 chorych na astmę (224 nowe przypadki, 108 długotrwałych), 98 osób w grupie kontrolnej	MIF	TAK – Występowanie astmy świeżo wykrytej i długotrwałej koreluje z cechami przebytego zakażenia CP. U kobiet IgG stwierdzono: u 11% zdrowych, 28% z nowo wykrytą astmą i 43% z astmą długotrwałą. U mężczyzn odpowiednio u 33%, 50%, 64%.
Barbaro i wsp. [64]	197 chorych na astmę, 185 zdrowych	MIF	NIE – Występowanie IgG przeciw CP tak samo częste w obu grupach.
Mills i wsp. [120]	198 dzieci (badanie w 11 i 21 r.ż.), w tym 96 chorych na astmę	MIF	NIE – Stężenie IgG przeciw CP niższe u chorych na astmę. Bez związku pomiędzy występowaniem objawów astmy a podwyższonym poziomem IgG, IgA przeciw CP.
Cook i wsp. [68]	46 chorych na astmę, 1518 osób przyjętych do szpitala z innych przyczyn	MIF	TAK – Cechy przebytego zakażenia CP częstsze u chorych na astmę (34,8%) niż u zdrowych (12,7%). Cechy ostrego zakażenia u 4,3% chorych na astmę i 5,7% zdrowych.
Nagy i wsp. [90]	139 dzieci z astmą, 174 zdrowych	EIA	NIE – IgA przeciw CP u 31% chorych na astmę i 32% zdrowych, IgG – odpowiednio: 44% i 47%, IgM – 20% i 25%.
Tuuminen i wsp. [117]	150 chorych na astmę, 150 zdrowych	EIA	NIE – CP: IgG u 52% chorych na astmę i 52% zdrowych, IgA – odpowiednio 31% i 37%. MP: IgG u 71% chorych na astmę i 70% zdrowych, IgA – odpowiednio u 3% i 5%.
Martin i wsp. [121]	55 chorych ze stabilną astmą, 11 zdrowych	PCR MIF(CP) EIA(MP)	TAK - Kolonizacja CP lub MP u 56 % chorych na astmę (MP – 25, CP – 6 osób) i u 1 osoby zdrowej. Serologia – MP: bez cech zakażenia w obu grupach. CP: cechy zakażenia u 18 chorych na astmę i 1 zdrowego.
Gencay i wsp. [62]	33 chorych z przewlekłą astmą, 33 zdrowych	MIF	TAK - IgA przeciw CP u 52% chorych na astmę i 15% zdrowych.
Huittinen i wsp. [63]	24 chorych ze świeżo rozpoznaną astmą, 62 chorych bez astmy (45 zdrowych, 17 z ostrym zap. oskrzeli)	MIF, EIA	TAK – IgG przeciw CP u 92% chorych na astmę, 84% zdrowych, 88% chorych na ostre zap. oskrzeli. IgA – u 72% chorych na astmę, 44% zdrowych, 88% chorych na ostre zap. oskrzeli.
Falck i wsp. [122]	100 chorych z serol. wykładnikami przewlekłego zakażenia CP i 100 osób bez tych cech	MIF	TAK – Astma częstsza u osób z cechami przewlekłego zakażenia CP (23%) niż u badanych bez podwyższonego IgA (7%).

von Hertzen i wsp. [76]	116 chorych na astmę, 50 zdrowych	MIF	TAK - Podwyższony poziom IgA przeciw CP u chorych na astmę w porównaniu ze zdrowymi. Korelacja pomiędzy ciężkością choroby a stężeniem IgA.
Biscione i wsp. [71]	74 pary małżeńskie: jeden małżonek – z astmą, drugi -zdrowy	RT-PCR	TAK-Cechy zakażenia dróg oddechowych przez CP u 22% chorych na astmę i 9% zdrowych.
Savvykoski i wsp.[123]	103 chorych na astmę, 30 zdrowych	EIA	TAK – Poziom IgA przeciw CP (HSP60) wyższy u chorych na astmę w porównaniu do zdrowych. Bez różnic w poziomie IgG, IgA przeciw antygenowi EB CP.
Kraft i wsp.[74]	18 chorych na przewlekłą astmę, 11 zdrowych	PCR	TAK – Kolonizacja przez MP u 10 chorych na astmę i 1 zdrowego. Kolonizacji przez CP nie stwierdzono.

Tabela III. Przegląd wybranych publikacji dotyczących związku zakażeń atypowymi bakteriami z astmą (CP – *Chlamydia pneumoniae*, MP – *Mycoplasma pneumoniae*).

Przeciwciała klasy G i A przeciw *Chlamydia pneumoniae* występowały istotnie częściej u chorych na astmę nieatopową, zaś w odniesieniu do *Mycoplasma pneumoniae* takich różnic nie stwierdzono. W większości badań dotyczących roli atypowych bakterii w rozwoju astmy nie uwzględniano współwystępowania atopii, przez co zjawisko to nie zostało do tej pory dobrze poznane. W badaniu kohortowym Normann i wsp. przeciwciała IgG przeciw *Chlamydia pneumoniae* występowały częściej wśród dzieci chorych na astmę bez cech atopii [124]. Z kolei w pracy von Hertzen i wsp. istotne różnice w częstości występowania IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono tylko pomiędzy chorymi na astmę nieatopową i zdrowymi. Przeciwciała klasy G występowały zarówno wśród chorych na astmę atopową jak i nieatopową częściej niż u osób zdrowych, choć najbardziej istotne różnice stwierdzono pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na astmę nieatopową [61]. Zarówno prezentowana praca jak i cytowane publikacje potwierdzają zatem przypuszczenia dotyczące rozwoju astmy nieatopowej, w której przewlekły proces zapalny miałby być indukowany nie przez kontakt z alergenem, ale z atypowym patogenem.

Podsumowując należy podkreślić, że niniejsza praca jako pierwsza wiąże przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae* z brakiem kontroli astmy. Wcześniejsze badania na temat związku atypowych bakterii i astmy w większości potwierdzały jedynie częstsze występowanie zakażeń u chorych na astmę w porównaniu z osobami zdrowymi lub ich rolę w zaostrzeniach.

Podobnych zależności nie stwierdzono dla zakażeń *Mycoplasma pneumoniae*. Choć w literaturze również brakuje przekonujących doniesień potwierdzających wpływ przewlekłego zakażenia tym patogenem na przebieg astmy, wiele wniesć mogą kolejne badania przeprowadzone na dużej grupie chorych w czasie obejmującym okres najczęstszych zachorowań.

Dalsze badania są również potrzebne w celu określenia najbardziej czułej i swoistej metody potwierdzającej kolonizację dróg oddechowych przez *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*. W prezentowanej pracy potwierdzono opisywane wcześniej występowanie istotnych różnic pomiędzy badaniem serologicznym i molekularnym.

Potwierdzono znaczenie atypowych bakterii w indukowaniu zaostrzeń astmy a także częstsze występowanie u chorych na astmę cech przebytego zakażenia *Chlamydia pneumoniae*, co przez wielu badaczy jest uznawane za pośredni dowód roli tej bakterii w patomechanizmie astmy, zwłaszcza nieatopowej.

7. WNIOSKI

1. Przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae* jest związane z gorszą kontrolą objawów astmy. Zależności takiej nie stwierdzono w odniesieniu do zakażeń *Mycoplasma pneumoniae*.
2. Zakażenia *Chlamydia pneumoniae* występują u chorych na astmę częściej niż u osób zdrowych, co wydaje się potwierdzać przypuszczenia na temat udziału tej bakterii w rozwoju astmy, szczególnie nieatopowej. Dla *Mycoplasma pneumoniae* nie potwierdzono tej zależności.
3. Określenie wartości genetycznej oceny płwociny indukowanej w rozpoznawaniu przewlekłych zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* wymaga dalszych badań.

8. STRESZCZENIE

Cel pracy

Celem pracy było określenie roli zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu astmy.

Material

Grupę badaną stanowiło 95 chorych na astmę, w tym 64 kobiety i 31 mężczyzn w wieku od 20 do 76 lat (średnia wieku - 47 lat). Włączano osoby z pewnym rozpoznaniem przewlekłej astmy, potwierdzonym dodatnią próbą odwracalności obturacji, leczone co najmniej od 6 miesięcy. Grupą kontrolną było 58 zdrowych osób, w tym 39 kobiet i 19 mężczyzn, w wieku od 20 do 80 lat (średnia wieku - 44 lata).

Metody

U wszystkich badanych przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe, wykonano spirometrię, punktowe testy skórne z wyciągami aeroalergenów oraz oznaczono przeciwciała klas G, M, A przeciw *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* (ELISA) w surowicy. Ponadto w wybranej grupie chorych na astmę oznaczono obecność materiału genetycznego *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* (PCR) w wydzielinie dróg oddechowych pozyskanej metodą tzw. indukowanej płwociny.

Wyniki

Spośród 95 chorych na astmę włączonych do badania u 25 (26,3%) stwierdzono dobrą kontrolę, u 23 (24,2%) – częściową kontrolę, zaś u 47 (49,5%) – brak kontroli objawów choroby. U 24 (25,3%) chorych na astmę rozpoznano lekką postać choroby, u 38 (40%) – postać umiarkowaną, zaś u 33 (34,7%) – postać ciężką. Przynajmniej jeden wynik dodatni testu skórniego stwierdzono u 51 chorych na astmę (53,7%) oraz u 7 osób zdrowych (12,1%).

Spośród 36 chorych z zaostrzeniem astmy, u 4 stwierdzono cechy świeżego zakażenia *Chlamydia pneumoniae*, zaś u kolejnych 4 – *Mycoplasma pneumoniae*.

Obecność przeciwciał klasy A przeciw *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 42 (44,2%) chorych na astmę oraz u 17 (29,3%) zdrowych. Występowały one istotnie częściej wśród chorych z niekontrolowanymi objawami astmy w porównaniu z grupą o dobrej kontroli objawów ($p=0,001$) oraz u chorych na astmę nieatopową ($p<0,05$). Wśród chorych, u których występowały IgA przeciw *Chlamydia pneumoniae*, częściej stwierdzano brak spełnienia każdego z kryteriów braku kontroli astmy.

Przeciwciała klasy G wykryto u 58 chorych (61%) oraz 21 (36,2%) osób zdrowych, istotnie częściej u chorych z niekontrolowanymi objawami ($p<0,05$) oraz chorych na astmę nieatopową ($p<0,05$).

Obecność przeciwciał klasy A przeciw *Mycoplasma pneumoniae* stwierdzono u 6 (6,3%) chorych na astmę oraz u 4 (6,9%) zdrowych. Przeciwciała klasy G wykryto u 13 chorych (13,7%) oraz 12 (20,7%) osób zdrowych. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy chorymi różniącymi się stopniem kontroli i stopniem ciężkości astmy.

Obecność *Chlamydia pneumoniae* w wydzielinie dróg oddechowych stwierdzono u 8 chorych (40%), *Mycoplasma pneumoniae* – u 2 chorych (10%). Tylko u 1 badanego wykryto obecność patogenu pomimo negatywnego badania serologicznego.

Wnioski

Przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae* jest związane z gorszą kontrolą objawów astmy. Zależności takiej nie stwierdzono w odniesieniu do zakażeń *Mycoplasma pneumoniae*.

Zakażenia *Chlamydia pneumoniae* występują u chorych na astmę częściej niż u osób zdrowych.

SUMMARY

Aim of the study

Aim of the study was to evaluate the influence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections on the course of asthma.

Patients

The study group was comprised of 95 asthmatics including 64 females and 31 males aged 20 - 76 ys (mean age - 47 ys). All the patients had persistent asthma confirmed by reversibility test and, on the day of inclusion, had been being treated for at least 6 months. Control group was comprised of 58 healthy individuals including 39 females and 19 males aged 20 - 80 (mean age - 44 ys).

Methods

In both groups medical history was collected and physical examination, spirometry, skin prick tests with aeroallergens as well as measurement of immunoglobulins G, M, A against *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* (ELISA) were performed. Additionally in the selected group of asthmatics presence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* genetic material was tested in induced sputum (PCR).

Results

In 25 out of 95 patients (26,3%) asthma was assessed to be controlled, in 23 (24,2%) – partly controlled, in 47 (49,5%) – uncontrolled. In 24 (25,3%) patients asthma was found mild, in 38 (40%) – moderate, in 33 (34,7%) – severe. At least one positive result of skin prick tests was found in 51 asthmatics (53,7%) and in 7 controls (12,1%).

Out of 36 patients with exacerbation of asthma, in 4 acute *Chlamydia pneumoniae* infection and in another 4 – *Mycoplasma pneumoniae* infection were diagnosed.

IgA against *Chlamydia pneumoniae* was found in 42 (44,2%) asthmatics and 17 (29,3%) controls. It was found more often in the group with uncontrolled asthma compared to controlled asthma patients ($p=0,001$) as well as in non-atopic asthmatics ($p<0,05$). In patients with IgA against *Chlamydia pneumoniae* all the criteria of uncontrolled asthma were met more often.

IgG was detected in 58 asthmatics (61%) and 21 (36,2%) controls, more often in cases of uncontrolled ($p<0,05$) and non-atopic asthma ($p<0,05$).

IgA against *Mycoplasma pneumoniae* was found in 6 (6,3%) asthmatics and 4 (6,9%) controls. IgG was detected in 13 asthmatics (13,7%) and 12 (20,7%) controls. No significant differences have been found between groups of varied asthma severity and level of control.

Chlamydia pneumoniae was detected in respiratory secretions of 8 asthmatics (40%), *Mycoplasma pneumoniae* – 2 asthmatics (10%). In 1 patient pathogen was found despite the negative result of serology.

Conclusions

Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection correlates with poor control of asthma. Such relation has not been found for *Mycoplasma pneumoniae* infections.

Chlamydia pneumoniae infections are more frequent in asthmatics compared to healthy individuals.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Med Prakt 2008; WS1.
2. Małolepszy J., Liebhart J., Wojtyniak B., Pisiewicz K., Płusa T.: Prevalence of allergic diseases in Poland. Alerg Astma Immunol 2000; 5: 163–169.
3. Mohangoo A., Essink-Bot M., Juniper E., Moll H., de Koning H., Raat H.: Health-related quality of life in preschool children with wheezing and dyspnea: preliminary results from a random general population sample. Quality of Life Research 2005; 14:1931-1936.
4. Ehlers P., Aberg H., Larsson K.: Quality of life in primary asthma. Respir Med 2001; 95: 22-30.
5. Chełmińska M., Werachowska L., Niedożytko M., Bolałek M., Szymanowska A., Damps-Konstańska I., Słomiński J., Jassem E.: Jakość życia chorych na astmę dobrze i źle kontrolowaną. Pneumonol Alergol Pol 2007; 75: 70-75.
6. Weiss K., Sullivan S.: The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 3-8.
7. Smith D., Malone D., Lawson K., Okamoto L., Battista C., Saunders W.: A national estimate of the economic costs of asthma. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 787-793.
8. Gray L., Peat J., Belousova E., Xuan W., Woolcock A.: Family patterns of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness: an epidemiological study. Clin Exp Allergy 2000; 30: 393-399.
9. Sears M., Burrows B., Flannery E., Herbison G., Holdaway M.: Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. Clin Exp Allergy 1993; 23: 941-948.
10. Palmer L., Burton P., Faux J., James A., Musk A., Cookson W.: Independent inheritance of serum immunoglobulin E concentrations and airway responsiveness. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1836-1843.

11. Laprise C., Boulet L.: Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a three-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 403-409.
12. Jansen D., Rijcken B., Schouten J., Kraan J., Weiss S., Timens W., Postma D.: The relationship of skin test positivity, high serum total IgE levels and peripheral blood eosinophilia to symptomatic and asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 924-931.
13. Nathan R., Sorkness C., Kosinski M., Schatz M., Li J., Marcus P., Murray J., Pendergraft T.: Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 59-65.
14. Green R., Brightling C., McKenna S., Hargadon B., Parker D., Bradding P., Wardlaw A., Pavord I.: Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 1715-1721.
15. Sont J., Willems L., Bel E., van Krieken J., Vandenbroucke J., Sterk P., Ampul Study Group: Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1043-1051.
16. Pijnenburg M., Bakker E., Hop W., Jongste J.: Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 831-836.
17. Bateman E., Boushey H., Bousquet J., Busse W., Clark T., Pauwels R., Pedersen S.: Can guideline-defined asthma control be achieved? The gaining optimal control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 836-844.
18. De Marco R., Bugiani M., Cazzoletti L., Carosso A., Accordini S., Buriani O., Carrozzi L., Dallari R., Giammanco G., Ginesu F., Marinoni A., Cascio V., Poli A., Struzzo P., Janson C.: The control of asthma in Italy. A multicentre descriptive study on young adults with doctor diagnosed current asthma. *Allergy* 2003; 58: 221-228.

19. Robinson D., Campbell D., Durham S., Pfeffer J., Barnes P., Chung K.: Systematic assessment of difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 478-483.
20. Brinke A., Sterk P., Masclee A., Spinhoven P., Schmidt J., Zwinderman A., Rabe K., Bel E.: Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J* 2005; 25: 812-818.
21. Wong C., Chua C., Liam C., Goh K.: Gastro-oesophageal reflux disease in 'difficult-to-control' asthma: prevalence and response to treatment with acid suppressive therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:1321-1327.
22. Ponte E., Franco R., Nascimento H., Souza-Machado A., Cunha S., Barreto M., Naspitz C., Cruz A.: Lack of control of severe asthma is associated with co-existence of moderate-to-severe rhinitis. *Allergy* 2008; 63: 564-569.
23. Dales R., Schweitzer I., Toogood J., Drouin M., Yang W., Dolovich J., Boulet J.: Respiratory infections and the autumn increase in asthma morbidity. *Eur Respir J* 1996; 9: 72-77.
24. Johnston S., Pattemore P., Sanderson G., Smith S., Lampe F., Josephs L., Symington P., O'Toole S., Myint S., Tyrrel D., Holgate S.: Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995; 310: 1225-1229.
25. Nicholson K., Kent J., Ireland D.: Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-986.
26. Teichtahl H., Buckmaster N., Pertnikovs E.: The incidence of respiratory tract infection in adults requiring hospitalization for asthma. *Chest* 1997; 112: 591-596.
27. Kayser F.: *Mikrobiologia lekarska*. Wyd. Lek. PZWL Warszawa 2007, 306-312.
28. Nitach-Osuch A., Choroszy-Król I., Wardyn A.: *Zakażenia wywołane przez Chlamydia pneumoniae*. Górnicki Wyd. Med. Wrocław 2001.

29. Zaremba M., Borowski J.: *Mikrobiologia lekarska*. Wyd. Lek. PZWL Warszawa 2004, 348-350.
30. Clements H., Stephenson T., Gabriel V., Harrison T., Millar M., Smyth A., Tong W., Linton C.: Rationalised prescribing for community acquired pneumonia: a closed loop. *Arch Dis Child* 2000; 83: 320-324.
31. Ferrari M., Poli A., Olivieri M., Tardivo S., Biasin C., Balestreri F., Dal Molin G., Lo Cascio V., Campello C.: Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in a young population sample living in Verona. *Infection* 2000; 28: 38-41.
32. Miyashita N., Niki Y., Nakajima M., Fukano H., Matsushima T.: Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. *Chest* 2001; 119: 1416-1419.
33. Ngeh J., Anand V., Gupta S.: *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis- what we know and what we don't. *Clin Microb Infect* 2002; 8: 2-13.
34. Blasi F.: Atypical pathogens and respiratory tract infections. *Eur Respir J* 2004; 24: 171-181.
35. Gaede K., Wilke G., Brade L., Brade H., Schlaak M., Muller-Quernheim J.: Anti-*Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin prevalence in sarcoidosis and usual interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2002; 19: 267-274.
36. Anttila T., Lehtinen T., Leinonen M., Bloigu A., Koskela P., Lehtinen M., Saikku P.: Serological evidence of an association between chlamydial infections and malignant lymphomas. *Br J Haemat* 1998; 103: 150-156.
37. Littman A., White E., Jackson L., Thornquist M., Gaydos C., Goodman G., Vaughan T.: *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1624-1630.

38. Jackson L., Wang S., Nazar-Stewart V., Grayston J., Vaughan T.: Association of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin A seropositivity and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1263-1266.
39. Menendez R., Cordoba J., Cuandra P., Cremades M., Lopez-Hontagas J., Salavert M., Gobernado M.: Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1868-1873.
40. Ruiz M., Ewig S., Marcos M., Martinez J., Arancibia F., Mensa J., Torres A.: Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 397-405.
41. Mansel J., Rosenow E., Smith T., Martin J.: *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Chest* 1989; 95: 639-646.
42. Perez C., Leigh M.: *Mycoplasma pneumoniae* as the causative agent for pneumonia in the immunocompromised host. *Chest* 1991; 100: 860-861.
43. Martin R., Chu H., Honour J., Harbeck R.: Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 577-582.
44. Maresh H., Klimek J., Quintiliani R.: Myocardial dysfunction and hemolytic anemia in a patient with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Chest* 1977; 71:410-413.
45. Daxboeck F., Krause R., Wenisch C.: Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microb Infect* 2003; 9: 263-273.
46. Hermann C., Graf K., Groh A., Straube E., Hartung T.: Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae* – specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microb* 2002; 40, 1603-1609.

47. Bramley A., Vitalis T., Wiggs B., Hegele R.: Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *Eur Respir J* 1999; 14: 1061-1067.
48. Eriksson M., Bennet R., Nilsson A.: Wheezing following lower respiratory tract infections with respiratory syncytial virus and influenza A in infancy. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11: 193-197.
49. Sigurs N., Bjarnason R., Sigurbergsson F., Kjellman B.: Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1501-1507.
50. Reijonen T., Kotaniemi-Syrjanen A., Korhonen K., Korppi M.: Predictors of asthma three years after hospital admission for wheezing in infancy. *Pediatrics* 2000; 106: 1406-1412.
51. Woś M., Sanak M., Soja J., Olechnowicz H., Busse W., Szczeklik A.: The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1082-1089.
52. Monick M., Powers L., Hassan I., Groskreutz D., Yarovinsky T., Barrett C., Castilow E., Tifrea D., Varga S., Hunninghake G.: Respiratory syncytial virus synergizes with Th2 cytokines to induce optimal levels of TARC/CCL17. *J Immunol* 2007; 179: 1648-1658.
53. Lee F., Walsh E., Falsey A., Lumb M., Okam N., Liu N., Divekar A., Hall C., Mosmann T.: Human infant respiratory syncytial virus (RSV)- specific type 1 and 2 cytokine responses ex vivo during primary RSV infection. *J Infect Dis* 2007; 195: 1779-1788.
54. Vitalis T., Kern I., Croome A., Behzad H., Hayashi S., Hogg J.: The effect of latent adenovirus 5 infection on cigarette smoke-induced lung inflammation. *Eur Respir J* 1998; 11: 664-669.

55. Yano T., Ichikawa Y., Komatu S., Arai S., Oizumi K.: Association of *Mycoplasma pneumoniae* antigen with initial onset of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1348-1353.
56. Hahn D., Bukstein D., Luskin A., Zeitz H.: Evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection in steroid-dependent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 80: 45-49.
57. Sirmatel F., Ustunsoy H., Sirmatel O., Akdemir I., Dikensoy O.: The relationship between *Chlamydia pneumoniae* seropositivity and peripheral vascular diseases, acute myocardial infarction and late-onset asthma. *Infection* 2003; 31: 367-368.
58. Korppi M., Paldanius M., Hyvarinen A., Nevalainen A., Husman T.: *Chlamydia pneumoniae* and newly diagnosed asthma: a case-control study in 1 to 6-year-old children. *Respirology* 2004; 9: 255-259.
59. Larsen F., Norn S., Mordhorst C., Skov P., Milman N., Clementsen P.: *Chlamydia pneumoniae* and possible relationship to asthma. Serum immunoglobulins and histamine release in patients and controls. *APMIS* 1998; 106: 928-934.
60. Routes J., Nelson H., Noda J., Simon F.: Lack of correlation between *Chlamydia pneumoniae* antibody titers and adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 391-392.
61. Von Hertzen L., Toyryla M., Gimishanov A., Bloigu A., Leinonen M., Saikku P., Haahtela T.: Asthma, atopy and *Chlamydia pneumoniae* antibodies in adults. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 522-528.
62. Gencay M., Rudiger J., Tamm M., Soler M., Perruchoud A., Roth M.: Increased frequency of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1097-1100.

63. Huittinen T., Hahn D., Antilla T., Wahlstrom E., Saikku P., Leinonen M.: Host immune response to *Chlamydia pneumoniae* heat shock protein 60 is associated with asthma. *Eur Respir J* 2001; 17: 1078-1082.
64. Barbaro M., Resta O., Aliani M., Guido P., Izzo C., Logroscino C., Epifani V., Bisconti M., Gerardi R., Del Prete R., Miragliotta G.: Seroprevalence of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection in patients affected by chronic stable asthma. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 358-362.
65. Lieberman D., Liberman D., Printz S., Ben-Yaakov M., Lazarovich Z., Ohana B., Friedman M., Dvorskin B., Leinonen M., Boldur I.: Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 406-410.
66. Wark P., Johnston S., Simpson J., Hensley M., Gibson P.: *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin A reactivation and airway inflammation in acute asthma. *Eur Respir J* 2002; 20: 834-840.
67. Allegra L., Blasi F., Centanni S., Cosentini R., Denti F., Raccanelli R., Tarsia P., Valenti V.: Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J* 1994; 7: 2165-2168.
68. Cook P., Davies P., Tunnicliffe W., Ayres J., Honeybourne D.: *Chlamydia pneumoniae* and asthma. *Thorax* 1998; 53: 254-259.
69. Myashita 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: 405-409.
70. Cunningham A., Johnston S., Julious S., Lampe F., Ward M.: Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. *Eur Resp J* 1998; 11: 345-349.

71. Biscione G., Corne J., Chauhan A., Johnston S.: Increased frequency of detection of *Chlamydia pneumoniae* in asthma. *Eur Respir J* 2004; 24: 745-749.
72. Webley W., Salva P., Andrzejewski C., Cirino F., West C., Tilahun Y., Stuart E.: The bronchial lavage of pediatric patients with asthma contains infectious *Chlamydia*. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1083-1088.
73. Harju T., Leinonen M., Nokso-Koivisto J., Korhonen T., Raty R., He Q., Hovi T., Mertsola J., Bloigu A., Ryttilä P., Saikku P.: Pathogenic bacteria and viruses in induced sputum or pharyngeal secretions of adults with stable asthma. *Thorax* 2006; 61: 579-584.
74. Kraft M., Cassell G., Henson J., Watson H., Williamson J., Marmion B., Gaydos C., Martin R.: Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the airways of adults with chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 998-1001.
75. Black P., Scicchitano R., Jenkins C., Blasi F., Allegra L., Włodarczyk J., Cooper B.: Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur Respir J* 2000; 12: 254-259.
76. Von Hertzen L., Vasankari T., Liippo K., Wahlström E., Puolakkainen M.: *Chlamydia pneumoniae* and severity of asthma. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 22-27.
77. Heinemann M., Susa M., Simnacher U., Marre R., Essig A.: Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in human monocyte cell line. *Infect Immun* 1996; 64: 4872-4875.
78. Redecke V., Dalhoff K., Bohnet S., Braun J., Maass M.: Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and human alveolar macrophages: Infection and inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 721-727.
79. Rupp J., Kothe H., Mueller A., Maass M., Dalhoff K.: Imbalanced secretion of IL-1 β and IL-1RA in *Chlamydia pneumoniae* – infected mononuclear cells from COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 22: 274-279.

80. Rodel J., Woytas M., Groh A., Schmidt K., Hartmann M., Lehmann M., Straube E.: Production of basic fibroblast growth factor and IL6 by human smooth muscle cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 2000; 68: 3635-3641.
81. Rodel J., Assefa S., Prochnau D., Woytas M., Hartmann M., Groh A., Straube E.: Interferon- β induction by *Chlamydia pneumoniae* in human smooth muscle cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 9-15.
82. Rodel J., Prochnau D., Prager K., Pentcheva E., Hartmann M., Straube E.: Increased production of matrix metalloproteinases 1 and 3 by smooth muscle cells upon infection with *Chlamydia pneumoniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38: 159-164.
83. Airenne S., Surcel H., Tuukkanen J., Leinonen M., Saikku P.: *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cells lines. *Scand J Immunol* 2002; 55: 360.
84. Rajalingan K., Al-Younes H., Muller A., Meyer T., Szczepek A., Rudel T.: Epithelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* are resistant to apoptosis. *Infect Immun* 2001; 69: 7880-7888.
85. Adachi T., Motojima S., Hirata A., Fukuda T., Kihara N., Kosaku A., Ohtake H., Makino S.: Eosinophil apoptosis caused by theophylline, glucocorticoids and macrolids after stimulation with IL-5. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: S207-215.
86. Fan T., Lu H., Hu H., Shi L., McClarty G., Nance D., Greenberg A., Zhong G.: Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 1998; 187: 487-496.
87. Sohn M., Lee K., Choi S., Kwon B., Chang M., Kim K.: Effect of *Mycoplasma pneumoniae* lysate on interleukin-8 gene expression in human respiratory epithelial cells. *Chest* 2005; 128: 322-326.

88. Esposito S., Droghetti R., Bosis S., Claut L., Marchisio P., Principi N.: Cytokine secretion in children with acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and wheeze. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34: 122-127.
89. Chu H., Honour J., Rawlinson C., Harbeck R., Martin R.: Hygiene hypothesis of asthma: a murine asthma model with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Chest* 2003; 123: 390S.
90. Nagy A., Kozma G., Keszei M., Treszl A., Falus A., Szalai C.: The development of asthma in children infected with *Chlamydia pneumoniae* is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 729-734.
91. Koch A., Melbye M., Sorensen P., Homoe P., Madsen H., Molbak K., Hansen C., Andersen L., Hahn G., Garred P.: Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285: 1316-1321.
92. Blotta M., DeKruyff R., Umetsu D.: Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4⁺ lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158: 5589-5595.
93. DeKruyff R., Fang Y., Umetsu D.: Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4⁺ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J Immunol* 1998; 160: 2231-2237.
94. Larsson S., Linden M.: Effects of corticosteroid, budesonide, on production of bioactive IL-12 by human monocytes. 1998; 10: 786-789.
95. John M., Lim S., Seybold J., Jose P., Robichaud A., O'Connor B., Barnes P., Chung K.: Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon- γ release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 156-162.

96. Hodge S., Hodge G., Flower R., Han P.: Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol* 1999; 49: 548-553.
97. Herten von L.: Role of persistent infection in the control and severity of asthma: focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Respir J* 2002; 19: 546-556.
98. Emre U., Roblin P., Gelling M., Dumornay W., Rao M., Hammerschlag M., Schachter J.: The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airway disease in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 727-732.
99. Hahn D., Golubjatnikow R.: Asthma and chlamydial infection: a case series. *J Fam Prakt* 1994; 38: 589-595.
100. Kraft M., Cassell G., Pak J., Martin R.: *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in asthma: Effect of clarithromycin. *Chest* 2002; 21: 1782-88.
101. Black P., Blasi F., Jenkins C., Scicchitano R., Mills G., Rubinfeld A., Ruffin R., Mullins P., Dangain J., Cooper B., David D., Allegra L.: Trial of Roxithromycin in subjects with asthma and serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 536-541.
102. Johnston S., Blasi F., Black P., Martin R.: The effect of telithromycin in acute exacerbation of asthma. *N Eng J Med* 2006; 354: 1589-1600.
103. Kostadima E., Tsiodras S., Alexopoulos E., Kaditis A., Mavrou I., Georgatou N., Papamichalopoulos A.: Clarithromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in patients with asthma. *Eur Respir J* 2004; 23: 714-717.
104. Shoji T., Yoshida S., Sakamoto H., Hasegawa H., Nakagawa H., Amayasu H.: Anti-inflammatory effect of roxithromycin in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 950-956.

105. Nelson H., Hamilos D., Corsello P., Levesque N., Buchmeier A., Bucher B.: A double-blind study of troleandromycin and methylprednisolone in asthmatic subjects who require daily corticosteroids. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 398-404.
106. Kamada A., Hill M., Ikle D., Brenner A., Szefer S.: Efficacy and safety of low-dose troleandromycin therapy in children with severe, steroid-requiring asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 873-882.
107. Amayashu H., Yoshida S., Eloana S.: Clarithromycin suppresses bronchial hyperresponsiveness associated with eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 84: 594-598.
108. Garey K., Rubinstein I., Gotfried M., Khan I., Varma S., Danziger L.: Long-term clarithromycin decreases prednisone requirements in elderly patients with prednisone-dependent asthma. *Chest* 2000; 118: 1826-1827.
109. Barbee R., Murphy S.: The natural history of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: S65-S72.
110. Laforest L., Van Ganse E., Devouassoux G., Bousquet J., Chretien S., Bauguil G., Pacheco Y., Chamba G.: Influence of patients' characteristics and disease management on asthma control. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1404-1410.
111. Temporano J., Mannino D.: The effect of sex on asthma control from the national asthma survey. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 854-860.
112. Arbes S., Gergen P., Vaughn B., Zeldin D.: Asthma cases attributable to atopy: results from the third national health and nutrition examination survey. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1139-1145.
113. Sunyer J., Jarvis D., Pekkanen J., Chinn S., Janson C., Leynaert B., Luczynska C., Garcia-Esteban R., Burney P., Anto J.: Geographic variations in the effect of atopy on

asthma in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1033-1039.

114. Samoliński B.: Prevalence of allergic diseases in Poland. ECAP study. Preliminary report. <http://ecap.pl/pdf/ecapreport.pdf>

115. Peters S., Jones C., Haselkorn T., Mink D., Valacer D., Weiss S.: Real-world evaluation of asthma control and treatment (REACT): findings from a national web-based survey. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1454-1461.

116. Cazzoletti L., Marcon A., Janson C., Corsico A., Jarvis D., Pin I., Accordini S., Almar E., Bugiani M., Carolei A., Cerveri I., Duran-Tauleria E., Gislason D., Gulsvik A., Jogi R., Marinoni A., Martinez-Moratalla J., Vermeire P., Marco R.: Asthma control in Europe: a real-world evaluation based on an international population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1360-1367.

117. Tuuminen T., Edelstein I., Punin A., Kislova N., Stratchounski L.: Use of quantitative and objective enzyme immunoassays to investigate the possible association between *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* antibodies and asthma. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 345-348.

118. Dalhoff K., Maass M.: Clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest* 1996; 110: 351-356.

119. Verkooyen R., Willemse D., Hiep-van Casteren S., Mousavi Joulandan S., Snijder R., van den Bosch J., van Helden H., Peeters M., Verbrugh H.: Evaluation of PCR, culture and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microb* 1998; 36: 2301-2307.

120. Mills G., Lindeman J., Fawcett J., Herbison G., Sears M.: *Chlamydia pneumoniae* serological status is not associated with asthma in children or young adults. *Int J Epidemiol* 2000; 29:280-284.

121. Martin R., Kraft M., Chu H., Berns E., Cassell G.: A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 595-601.
122. Falck G., Gnarpe J., Hansson L., Svardsudd K., Gnarpe H.: Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*: respiratory morbidity and the metabolic syndrome. *Chest* 2002; 122: 1587-1593.
123. Savykoski T., Harju T., Paldanius M., Kuitunen H., Bloigu A., Wahlstrom E., Ryttilä P., Kinnula V., Saikku P., Leinonen M.: *Chlamydia pneumoniae* infection and inflammation in adults with asthma. *Respiration* 2004; 71: 120-125.
124. Normann E., Gnarpe J., Wettergren B., Janson C., Wickman M., Nordvall L.: Association between *Chlamydia pneumoniae* antibodies and wheezing in young children and the influence of sex. *Thorax* 2006; 61: 1054-1058.

10. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1. Kwestionariusz wywiadu lekarskiego.

KWESTIONARIUSZ WYWIADU LEKARSKIEGO

Imię i nazwisko pacjenta: _____

Data urodzenia: _____

Adres: _____

Tel. _____

Data wypełnienia ankiety: _____

1. Od jak dawna choruje Pani/Pan na astmę oskrzelową?

.....

2. Czy początek choroby był związany z objawami zakażenia dróg oddechowych ?

- ☐ Tak
- ☐ Nie
- ☐ Nie wiem

3. Jak często występują u Pani/Pana objawy choroby (duszność, kaszel, świszczący oddech)?

- ☐ Rzadziej niż raz w tygodniu
- ☐ 1-2 razy w tygodniu
- ☐ Częściej niż dwa razy w tygodniu ale nie codziennie
- ☐ Codziennie

4. Jak często powyższe objawy występują w nocy?

- ☐ Nie częściej niż 2 razy w miesiącu
- ☐ Częściej niż 2 razy w miesiącu
- ☐ Częściej niż raz w tygodniu

5. Kiedy w ciągu roku występują wymienione wyżej dolegliwości?

- ☐ Dolegliwości mają charakter przewlekły i występują stale przez cały rok z takim samym nasileniem.
- ☐ Dolegliwości występują stale przez cały rok, ale w pewnych miesiącach ulegają nasileniu. (w jakich miesiącach występują nasilenia?.....)
- ☐ Dolegliwości pojawiają się tylko w określonych miesiącach. (w jakich miesiącach?.....)

☐ Dolegliwości pojawiają się nieregularnie, przez cały rok (jak często?)

- ☐ 1-4 razy w roku
- ☐ 5-10 razy w roku
- ☐ częściej niż 10 razy w roku.

6. Czy dolegliwości pojawiają się lub nasilają przy wykonywaniu określonej czynności?

- ☐ Nie, dolegliwości nie są związane z konkretnymi czynnościami.
- ☐ Tak, dolegliwości nasilają się przy :
 - ☐ Pracach domowych
 - ☐ Czynnościach zawodowych
 - ☐ Wysiłku fizycznym
 - ☐ Innych czynnościach (jakich?)

.....

7. Ile razy w ciągu minionego tygodnia stosowano lek doraźnie w celu przerwania duszności?

- ☐ Nie więcej niż 2 razy
- ☐ Więcej niż 2 razy

8. Czy miewa Pani/Pan zaostrzenia astmy spowodowane zakażeniem dróg oddechowych?

- ☐ Nie, nigdy.
- ☐ Tak, rzadziej niż raz w roku.
- ☐ Tak, kilka razy w roku (ile?.....)

9. Czy kiedykolwiek rozpoznano u Pani/Pana zakażenie bakterią *Chlamydia pneumoniae* lub *Mycoplasma pneumoniae*?

- ☐ Tak, rozpoznano na podstawie.....
- ☐ Nie, nie rozpoznano

10. Czy choruje Pani/Pan na inne niż astma choroby alergiczne?

Tak, choruję na:

- ☐ Alergiczny nieżyt nosa
- ☐ Alergiczne zapalenie spojówek
- ☐ Atopowe zapalenie skóry
- ☐ Wyprysk kontaktowy
- ☐ Pokrzywkę

☐ Nie.

11. Czy ma Pan/Pani kontakt ze zwierzętami w mieszkaniu lub w miejscu pracy?

Czy taki kontakt miał miejsce w przeszłości?

- ☐ Nie, nigdy nie miałem/miałam kontaktu ze zwierzętami.
- ☐ Tak miałem/ miałam kontakt z następującymi zwierzętami :

.....
.....

12. Czy dolegliwości pojawiały się lub nasilały przy kontakcie ze zwierzęciem?

- ☐ Nie.
- ☐ Tak (zwierzę:

.....,
Dolegliwości:
.....)

13. Czy dolegliwości pojawiały się po spożyciu określonych pokarmów?

Czy występuje niechęć do określonych pokarmów?

- ☐ Nie, nie występuje.
- ☐ Tak, odczuwam niechęć/ nie toleruję następujących pokarmów:
 - ☐ Mleko
 - ☐ Sery
 - ☐ Ryby
 - ☐ Orzechy
 - ☐ Owoce cytrusowe
 - ☐ Pomidory
 - ☐ Owoce morza
 - ☐ Jaja
 - ☐ Inne:

.....
.....

14. Jakie dolegliwości pojawiły się po spożyciu powyższych pokarmów?

.....
.....
.....

15. Czy występuje nadwrażliwość na jady owadów (pszczoły, osy) ?

- ☐ Nie.
- ☐ Tak, po ukąszeniu przez (gatunek owada)

.....
Występują następujące objawy:
.....
.....

16. Czy kiedykolwiek wystąpiły objawy nadwrażliwości na leki?

- ☐ Nie, nigdy nie występowały
- ☐ Tak, wywołały je następujące leki:

.....
.....

17. Jakie dolegliwości występowały po przyjęciu zaznaczonych powyżej leków?

- ☐ Duszność
- ☐ Kaszel
- ☐ Pokrzywka
- ☐ Zaczerrwienie twarzy
- ☐ Katar
- ☐ Wymioty
- ☐ Biegunka
- ☐ Inne:.....

18. Czy występuje nietolerancja kosmetyków, detergentów bądź innych środków chemicznych używanych w życiu codziennym?

- ☐ Nie, nie występuje.
- ☐ Tak, występują objawy nietolerancji następujących produktów:

.....
.....

19. Jakie leki przyjmował(a) Pan/ Pani ostatnio?

Nazwa	dawka	przyjmuję od
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		

22. Czy ktoś z krewnych cierpi na choroby alergiczne?

.....
.....
.....

Załącznik nr 2. Wynik badania fizykalnego.

BADANIE PRZEDMIOTOWE W DNIU

(Wklejka do historii choroby)

Nazwisko i imię pacjenta/ki

PESEL

Nr Ks. Głównej / Oddziałowej

WRAŻENIA OGÓLNE: (nie)przytomny, zamroczony, senny, chodzący, leżący)

UŁOŻENIE: dowolne, przymusowe:

KONTAKT SŁOWNY: łatwy, trudny, niemożliwy

BUDOWA CIAŁA: (nie)prawidłowa

STAN ODŻYWIENIA: SGA:

A

B

C

BMI

(określić właściwie)

SKÓRA: BARWA – różowa, blada, zasiniona, zażółcona

WYKWITY: (nie)stwierdza się, wybroczyny, plamiste, grudkowate, pęcherzykowe, owrzodzenia

lokalizacja:

BLIZNY: (nie)stwierdza się

UCIEPLENIE: ciepła, chłodna, szorstka, łuszcząca się

OBRZĘKI: (nie)stwierdza się, na stopach, podudziach, okolicy krzyżowej

twarzy (powieki), uogólnione

TK. PODSKÓRNA: rozwinięta – dobrze, niemię, słabo

WĘZŁY CHŁONNE: (nie)macalne, wielkości: grochu, wiśni, orzecha

(nie)bolesne, (nie)zespalone ze skórą

podłożem

twarde, miękkie

Lokalizacja: podżuchwowe, karkowe, przyuszne, nad – podobojczykowe

pachowe, pachwinowe

GŁOWA I SZYJA

CZASZKA: krótko, średnio, długo – miarowa, wieżowata

NA OPUK: (nie)bolesna

pkt. n. V na ucisk (nie)wrażliwe: I, II, III

gał. str. lewej, prawej

OCZY – OSADZONE (nie)prawidłowo: exophthalmus, enophthalmus

ptosis

RUCHOME: (nie)prawidłowe – nystagmus,

obj. Graefego, Kochera, Moebiusa, Stellwaga

SPOJÓWKI: blade, różowe, przekrwione, entropion, ektropion

TWARDÓWKI: białe, błękitne, zażółcone

ŻRENICIE: (nie)równe, (nie)okragle, na światło, nastawność
(nie) reagują prawidłowo: mydriasis, myosis, anisocoria, objaw Argyll – Robertsona

OSTROŚĆ WZROKU: prawidłowa, dalekowidz, krótkowidz

NOS: (nie)symetryczny, (nie)drożny. WYDZIELINA: (nie)stwierdza się, skąpa, obfita, ropna, krwista, śluzowata

USZY: zew. bez zmian, wyr. sutkowy, skrawek na ucisk (nie)bolesny

J. USTNA: ŚLUZÓWKI – wilgotne, podsycające, suche, blade, różowe, zasinione (nie)obłożone nalotem, wykwyty

JĘZYK: (nie)obłożony śluzem, obfitym nalotem, barwy

(nie)prawidłowo ruchomy, suchy, podsycający, wilgotny

MIGDAŁKI: (nie)powiększone czyste, obłożone nalotem

ZĘBY: (nie)uporządkowane, protezy szczęki: górnej, dolnej

SZYJA: (nie)symetryczna, ruchoma (nie)prawidłowo OBWÓD:cm

TARCZYCA: (nie)powiększona, (nie)symetryczna, wole

..... konsystencji

szmer naczyniowy (nie)obecny

KLATKA PIERSIOWA

WYGLĄD OGÓLNY: (nie)symetryczna

USTAWIONA: wdechowo, rozejmowa, płaska, szewska, kurza

TOR ODDECHOWY: piersiowy, brzuszny, mieszany

RUCH. ODDECHOWA: prawidłowa, upośledzona

ILOŚĆ ODDECHÓW: / min

ODGŁOS OPUKOWY: jawny bębnowy

przytłumiony stłumiony

GRANICE DOLNE PŁUC

	3	7	9	9		5	7	9	9
pluco lewe	4	8	10	10	pluco prawe	6	8	10	10
	5	9	11	11		7	9	11	11

OSŁUCHOWO: szmer pęcherzykowy: prawidłowy

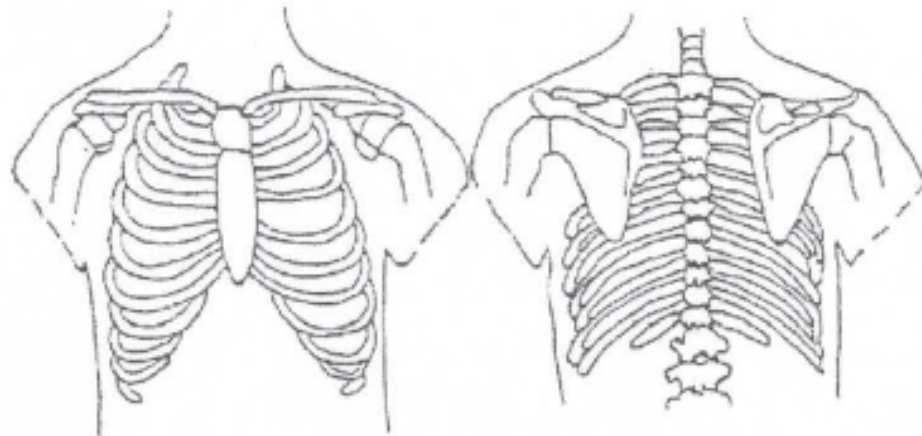
zaostrozony osłabiony

szorstki z wydł. wydechem

rzęzenia: wilgotne – (nie)dźwięczne, grubo, średnio, drobno – bańkowe

suche – świsty, furczenia, gwizdy tarcie

opłucnowe.....



OKOLICE SERCA: zewn. bez zmian, garb sercowy, patologia tętnien.....

UDERZENIE KONIUSZKOWE: (nie)widoczne, (nie)wyczuwalne w
rozlane unoszące

GRANICE STŁ. BEZWZGL. góra: lewa:

prawa:

OSŁUCHOWO: akcja serca (nie)miarowa /min. niemiarywość zupełna,
extrasystole

TONY: głośne, ciche, głuche (nie)prawidłowo akcentowane

SZMERY: (nie)stwierdza się

TĘTNO: na tętnicach obwodowych /min.

(nie)zgodne z akcją serca, deficyt

RR / mmHg

UKŁAD ŻYLNÓ - OBWODOWY:

JAMA BRZUSZNA

WYGLĄD OGÓLNY: brzuch (nie)symetryczny – wysklepiony powyżej kl. piersiowej

naczynia żyłne (krążenie uboczne)

pepek wciągnięty, uwypuklony, w poziomie powłok. PALPACYJNIE powłoki – miękkie

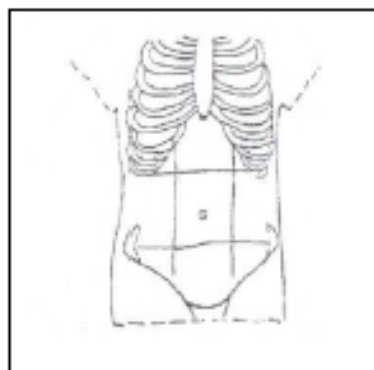
obrona mięśniowa

OBJ. OTRZEWNOWE (-) OBJ. GOLDFLAMA (-) lewy, prawy

OBJ. CHEŁMOŃSKIEGO (-)

PERYSTALTYKA OPÓR PATOLOGICZNY

WĄTROBA: (nie)macana, wystaje na pp poniżej łuku żeber, gładka, wyboista, twarda, miękka, (nie)bolesna, tkliwa, brzeg wątroby



TRZUSTKA:

NERKI:

ŚLEDZIONA: (nie)macana, wystaje na pp poniżej łuku żeber, gładka, wyboista, twarda, miękka, (nie)bolesna, tkliwa

PIERŚCIENIE PRZEPUKLINOWE: wole, przepuklina kresy białej, pępkowa, pachwinowa: prosta, skośna, mosznowa

NARZĄDY PŁCIOWE: zewn. bez zmian

BADANIE RECTUM: zylaki odbytu

UKŁAD MIĘŚNIOWY:

UKŁAD KOSTNO – STAWOWY: zewn. bez zmian; deformacje upośledzenie funkcji:

OBJAWY OPONOWE: sztywność karku (-) na pp obj. Kerniga (-) obj. Brudzńskiego (-)

ODRUCHY: okostnowe i ścięgniste – (nie)równe, żywe wyrównane osłabione zniesione obj. Babińskiego (-)

ROZPOZNANIE WSTĘPNE:

Załącznik nr 3. Klasyfikacja ciężkości astmy - na podstawie obrazu klinicznego przed leczeniem wg GINA.

Stopień ciężkości astmy	Obraz kliniczny
Stopień I Astma sporadyczna	1. Objawy rzadziej niż raz w tygodniu. 2. Zaostrzenia krótkotrwałe. 3. Objawy nocne nie częściej niż dwa razy w miesiącu. - $FEV_1 \geq 80\%$ wartości należnej lub $PEF \geq 80\%$ wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub $FEV_1 < 20\%$
Stopień II Astma przewlekła lekka	1. Objawy częściej niż raz w tygodniu, ale rzadziej niż jeden raz dziennie. 2. Zaostrzenia mogą zaburzać sen i utrudniać dzienną aktywność. 3. Objawy nocne częściej niż dwa razy w miesiącu. - $FEV_1 \geq 80\%$ wartości należnej lub $PEF \geq 80\%$ wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub FEV_1 20-30%
Stopień III Astma przewlekła umiarkowana	1. Objawy występują codziennie. 2. Zaostrzenia mogą zaburzać sen i utrudniać dzienną aktywność. 3. Objawy nocne częściej niż raz w tygodniu. 4. Konieczność inhalacji krótkodziałającego β_2 -adrenomimetyku codziennie. - FEV_1 60-80% wartości należnej lub PEF 60-80% wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub $FEV_1 > 30\%$
Stopień IV Astma przewlekła ciężka	1. Objawy występują codziennie. 2. Częste zaostrzenia. 3. Częste objawy nocne. 4. Ograniczenie aktywności fizycznej. - $FEV_1 \leq 60\%$ wartości należnej lub $PEF \leq 60\%$ wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub $FEV_1 > 30\%$.

Klasyfikacja ciężkości astmy - na podstawie stosowanego leczenia i jego skuteczności wg GINA.

Objawy i wyniki badań czynnościowych płuc w czasie aktualnie stosowanego leczenia	Aktualny stopień intensywności leczenia		
	I° - leczenie jak w astmie sporadycznej	II° - leczenie jak w astmie przewlekłej lekkiej	III° - leczenie jak w astmie przewlekłej umiarkowanej
	Stopień ciężkości		
Stopień I – astma sporadyczna - objawy rzadziej niż raz w tygodniu -napady (zaostżenia) krótkotrwałe -napady nocne nie częściej niż dwa razy w miesiącu -między napadami czynność płuc prawidłowa	sporadyczna	przewlekła lekka	przewlekła umiarkowana
Stopień II – astma przewlekła lekka - objawy częściej niż raz w tygodniu, ale rzadziej niż raz dziennie - objawy nocne częściej niż dwa razy w miesiącu, ale rzadziej niż raz w tygodniu - między napadami czynność płuc prawidłowa	przewlekła lekka	przewlekła umiarkowana	przewlekła ciężka
Stopień III – astma przewlekła umiarkowana - objawy występują codziennie - zaostżenia mogą zaburzać sen i utrudniać dzienną aktywność -objawy nocne co najmniej raz w tygodniu - FEV ₁ 60-80% - PEF 60-80%	przewlekła umiarkowana	przewlekła ciężka	przewlekła ciężka
Stopień IV – astma przewlekła ciężka - objawy występują codziennie - częste zaostżenia - częste objawy nocne - FEV ₁ ≤ 60% - PEF ≤ 60%	przewlekła ciężka	przewlekła ciężka	przewlekła ciężka

Załącznik nr 4. Stopnie kontroli astmy wg raportu GINA.

	Kontrolowana (spełnione wszystkie warunki)	Częściowo kontrolowana	Niekontrolowana
Objawy dzienne	Brak (2 razy lub mniej w tygodniu)	Więcej niż 2 razy w tygodniu	Trzy lub więcej cechy częściowo kontrolowanej astmy w czasie tygodnia
Ograniczenie aktywności fizycznej	Brak	Jakiegokolwiek	
Objawy / wybudzenia nocne	Brak	Jakiegokolwiek	
Zapotrzebowanie na leki stosowane doraźnie	Brak (2 razy lub mniej w tygodniu)	Więcej niż 2 razy w tygodniu	
Badania czynnościowe (PEF lub FEV ₁)	W normie	<80% wartości należnej lub najlepszej dla danego chorego (jeśli znana)	
Zaostrzenia	Brak	Jedno lub więcej w roku	W danym tygodniu