

**Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski**

**Beata Dolik**

**ROLA ZAKAŻENIA *CHLAMYDIOPHILA (CHLAMYDIA) PNEUMONIAE*  
W WYWOŁYWANIU ZAOSTRZEŃ ASTMY U DZIECI.**

**Praca doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jacek J. Pietrzyk**

**Pracę wykonano w Klinice Chorób Dzieci Katedry Pediatrii**

**Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**

**Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Jacek J. Pietrzyk**

**Kraków, 2006**

**Praca naukowa finansowana ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w latach  
2003-2006 jako projekt badawczy.**

Mojemu Promotorowi Wielce Szanownemu Panu Prof. dr hab. Jackowi J. Pietrzykowi wyrażam najserdeczniejsze podziękowania za inspiracje tematem, opiekę naukową oraz wszechstronną pomoc w realizacji tej pracy.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu i Katedry Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

**SPIS TREŚCI**

	Strona
1. Wykaz skrótów.....	4
2. Wprowadzenie.....	5
2.1 Charakterystyka gatunku <i>Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae</i> .....	5
2.1.1 Klasyfikacja gatunku.....	5
2.1.2 Cykl rozwojowy.....	7
2.1.3 Budowa antygenowa i patogenezę zakażeń.....	10
2.1.4 Epidemiologia.....	14
2.1.5 Diagnostyka.....	15
2.1.6 Leczenie.....	19
2.2 Astma oskrzelowa.....	21
2.2.1 Definicja i klasyfikacja.....	21
2.2.2 Epidemiologia.....	21
2.2.3 Czynniki ryzyka.....	22
2.2.4 Astma oskrzelowa a zakażenia układu oddechowego.....	23
2.2.5 Diagnostyka i leczenie.....	26
3. Cel pracy.....	29
4. Materiał i metoda.....	30
4.1 Grupy badane.....	30
4.2 Materiał.....	33
4.3 Pobieranie materiału.....	33
4.4 Oznaczenie poziomu przeciwciał dla <i>Ch. pneumoniae</i> w surowicy krwi.....	36
4.5 Analiza statystyczna.....	39
5. Wyniki.....	40
5.1 Wyniki badania.....	40
6. Dyskusja.....	56
7. Wnioski.....	64
8. Streszczenie.....	65
9. Summary.....	68
10. Piśmiennictwo.....	71
11. Spis tabel.....	87
12. Spis rycin.....	89
13. Aneks.....	91

## 1. Wykaz skrótów

AB – ciała atypowe

AI – atypowe wtęty

AIDS - nabyty zespół niedoboru odporności

ATP- adenzynotrójfosforan

BAL – popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe

CMV – wirus cytomegalii

DNA- kwas dezoksyrybonukleinowy

EB – ciało podstawowe, zakaźne chlamydii

ELISA – test immunoenzymatyczne

FEV1 – natężona objętość wydechowana pierwszosekundowa

FITC – izotiocyanian fluoresceiny

FVC – maksymalny przepływ wydechowy

GINA - Światowa Strategia rozpoznawania, leczenia i prewencji Astmy

GKS – glikokortykosteroidy

GKSw – glikokortykosteroidy wziewne

GM-CSF - granulocyte/macrophage - colony-stimulating factors

HSPs – białka szoku termicznego

IB – ciała wtętowe

IL - interleukina

ISAAC - The International Study of Astma and Allergies in Childhood

ITCF - izotiocyanian fluoresceiny

KBN – Komitet Badań Naukowych

LDL – lipoproteina o niskiej gęstości

LPS – kompleks lipopolisacharydowy

LT C-F- leukotrieny klasy C-F

MEF<sub>25-75%</sub> – uśredniony maksymalny przepływ wydechowy dla 25-75% FVC

MIF – metoda mikroimmunofluorescencji pośredniej

OMP – termolabilne główne białko zewnątrz błonowe

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

Omp – białka błony zewnętrznej

OWD – odczyn wiązania dopełniacza

PBS – zbuforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej służący jako rozcieńczalnik przy mianowaniu surowic

PCR - *polymerase chain reaction*

## 2. Wprowadzenie

Drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* pozostają w centrum zainteresowania badaczy od ponad 100 lat. Pierwsze doniesienia na ich temat pochodzą z prac Halberstaeder'a i von Provazek'a z początku XX wieku. Historia bakterii zaliczanych do gatunku *Chlamydia pneumoniae* sięga roku 1965, kiedy z oka tajwańskiego dziecka, chorego na jaglicę wyizolowano szczep chlamydii oznaczony symbolem TW-183, nieodpowiadający charakterystyce szczepów gatunku *Chlamydia trachomatis* (2, 3, 54).

Po opracowaniu metody hodowli chlamydii na liniach komórkowych, stwierdzono, że inkluzje szczepu TW-183 są morfologicznie zbliżone do wtętotów komórkowych tworzonych przez *Chlamydia psittaci* i nie posiadają glikogenu. W roku 1983 wyizolowano szczep AR-39, pochodzący z gardła studenta z Seattle (4, 5, 6). Te dwa izolaty TW-183 i AR-39 zaczęto określać wspólną nazwą *Chlamydia sp. szczep TWAR* i początkowo zaliczono do gatunku *Chlamydia psittaci* (4, 8).

Ponieważ jedynymi objawami klinicznymi zakażeń wywoływanych przez ten drobnoustrój było zapalenie płuc i oskrzeli, szczepy TWAR nazwano w 1986 roku - *Chlamydia pneumoniae*. Dopiero w 1989 roku drobnoustrój ten został zaklasyfikowany jako nowy gatunek rodzaju *Chlamydia*, na podstawie unikalnej struktury ciałek elementarnych i homologii DNA (7, 8, 9).

W roku 1999 zaproponowano nową systematykę rzędu *Chlamydiales*. Wtedy nazwa gatunkowa *Chlamydia pneumoniae* uległa zmianie na *Chlamydophila pneumoniae*, obecnie w nomenklaturze mikrobiologicznej funkcjonują obie nazwy gatunku (3, 7, 8).

W 1989 roku, wkrótce po odkryciu, pojawiły się pierwsze poszlaki wskazujące na możliwy związek zakażenia wywoływanego przez *Chlamydia pneumoniae* z rozwojem lub zaostrzeniami astmy oskrzelowej (1, 4, 6).

### 2.1. Charakterystyka gatunku *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae*

#### 2.1.1 Klasyfikacja gatunku

Drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia*, zwane dawniej *Bedsonia*, *Miyagawanella*, *Rickettsiformis*, *Enrichia*, *Rakeya* zostały poznane dokładniej a następnie określone taksonomicznie w 1974 roku. Aktualnie obowiązuje systematyka rzędu *Chlamydiales* z 1999 roku oparta na homologii DNA:

**Rząd:** *Chlamydiales*

**Rodzina I:** *Chlamydiaceae*

**Rodzaj:** *Chlamydophila*

**Gatunek:** *Chlamydophila abortus*

*Chlamydophila felis*

*Chlamydophila pecorum*

*Chlamydophila psittaci*

***Chlamydophila pneumoniae***

*odmiana TWAR*

*odmiana Koala*

*odmiana Equine*

**Rodzaj:** *Chlamydia*

**Gatunek:** *Chlamydia muridarum*

*Chlamydia suis*

*Chlamydiatrachomatis*

Do rodzaju *Chlamydophila* należą obecnie dwa chorobotwórcze dla człowieka drobnoustroje *Chlamydophila pneumoniae* i *Chlamydophila psittaci* (7, 8, 9).

Chociaż pierwotnie były zaliczane do protozoa, następnie do wirusów chlamydie są ziarenkowatymi bakteriami Gram-ujemnymi, niewykazującymi ruchu. Należą do grupy drobnoustrojów prokariotycznych, których głównym składnikiem ściany komórkowej jest lipopolisaharyd. Chlamydie są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi posiadającymi cechy zarówno bakterii, jak i wirusów (2, 7, 10, 12, 13, 49, 54).

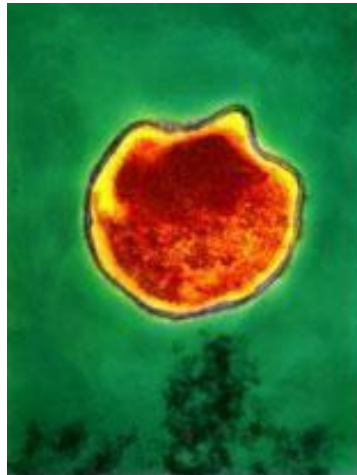
**Tabela 1. Charakterystyka cech biologicznych Chlamydii**

Cechy bakterii	Cechy wirusów
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ściana komórkowa podobna do występującej u bakterii Gram-ujemnych</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Wielkość 0,2-1,3 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Obecność kwasów nukleinowych (DNA i RNA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Brak własnych mechanizmów wytwarzania energii metabolicznej wykorzystywanej na potrzeby wewnątrzkomórkowego cyklu rozwojowego „pasożyty energetyczne”.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rozmnażanie przez podział poprzeczny</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tworzenie wtretów wewnątrz cytoplazmy zakażonych komórek</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Liczne organelle komórkowe</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ziarenkowaty, okrągły lub owalny kształt</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Wrażliwość na niektóre antybiotyki</li> </ul>	

Ze względu na brak zdolności syntezy własnego ATP, rozwój *Chlamydiae* jest możliwy tylko wewnątrz komórki żywiciela. W związku z tym często są określane jako pasożyty energetyczne. Szczepy *Ch. pneumoniae* posiadają wszystkie cechy charakterystyczne dla rzędu *Chlamydiales* takie jak: bezwzględne pasożytnictwo wewnątrzkomórkowe, obecność swoistego lipopolisacharydu oraz unikalny dwuetapowy cykl rozwojowy (11, 12, 13, 49, 54).

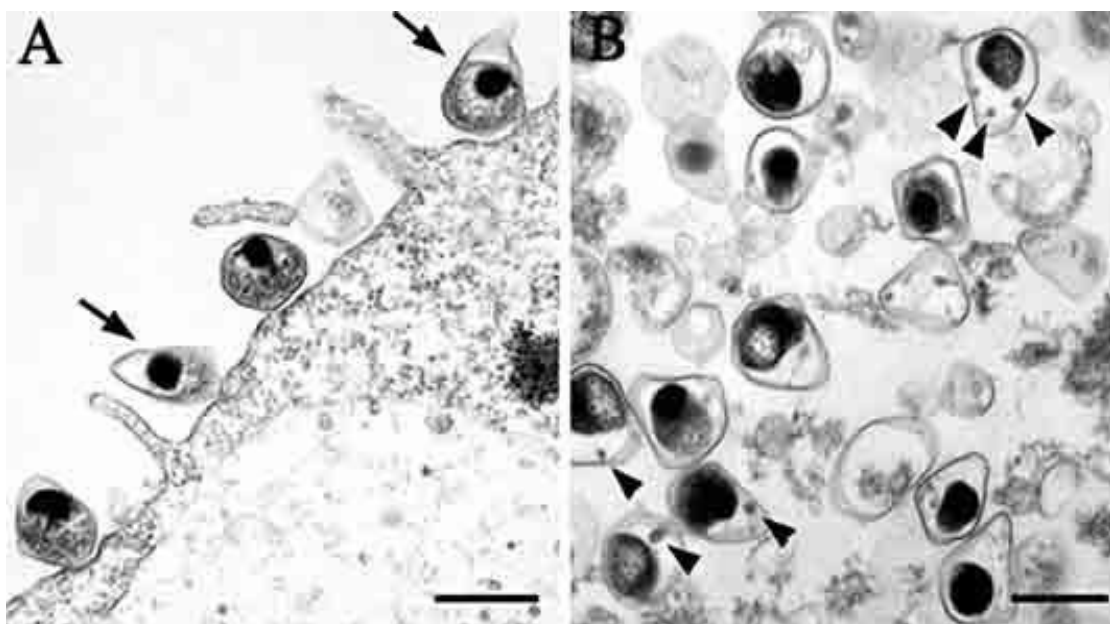
### 2.1.2 Cykl rozwojowy

Chlamydie w czasie rozmnażania przechodzą charakterystyczny dwuetapowy cykl rozwojowy, wyróżniający je w świecie bakterii. Bakterie te są zakaźne jedynie w formie metabolicznie nieaktywnej, zawierającej nukleoid i określanej jako **ciałko podstawowe (EB-elementary body)** (14,16).



**Ryc.1 Ciałko podstawowe  
*Chlamydia pneumoniae* (wg 16)**

Ciałko podstawowe (EB) *Ch. pneumoniae* charakteryzuje się dużą gęstością, średnicą ok. 0,38  $\mu\text{m}$  i zwartą strukturą zapewniającą jej odporność na czynniki środowiskowe. Różni się wyglądem od pozostałych gatunków, ma gruszkowaty kształt z dużą przestrzenią periplazmatyczną, posiada otoczkę stanowiącą około 15% masy i zawierającą hemaglutyninę (ułatwiająca wnikanie chlamydii do zaatakowanej komórki gospodarza). Ciało podstawowe (EB) zawiera również dodatkowe miniaturowe ciała (minibodies) niespotykane u innych gatunków chlamydii. W postaci ciała podstawowego (EB), chlamydie mogą przebywać poza komórką żywiciela, ale nie są zdolne do rozmnażania. Wniknięcie EB rozpoczyna się adsorpcją drobnoustroju na powierzchni komórki gospodarza. Zaostrzony koniec EB stanowi miejsce wstępnego kontaktu drobnoustroju z powierzchnią komórki gospodarza (14, 15, 16, 54).

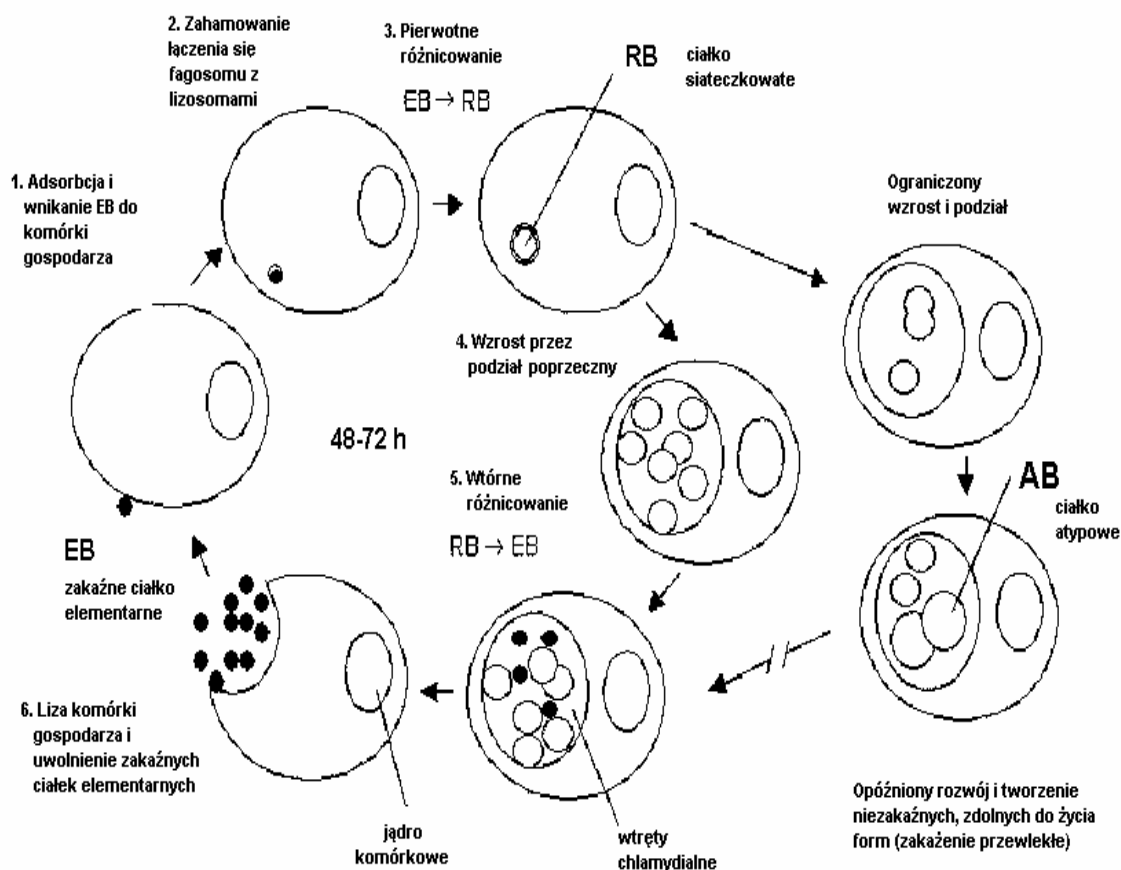


**Ryc. 2** Ciałka elementarne (EB) *Chlamydia pneumoniae* atakujące komórkę gospodarza (A) i po przekształceniu zakaźnego EB w aktywne metabolicznie ciało siateczkowate RB (B) (wg 19)

Do cytoplazmy komórki gospodarza EB wnika wewnątrz powstałego fagosomu, w którym pozostaje w formie wtretów lub następuje jego transformacja w ciało siateczkowate (RB- reticulate body). Chlamydie mają unikalną zdolność hamowania fuzji fagosomu z lizosomami, co chroni je przed wewnątrzkomórkowym strawieniem, a pozwala na korzystanie ze składników odżywczych cytoplazmy. Po ok. 6-8 godzinach od wnikięcia ciało podstawowe (EB) ulega reorganizacji w RB (o średnicy ok. 0,5-1  $\mu\text{m}$  i zwiększonej ilości RNA). RB jest formą aktywną metabolicznie, ma zdolność syntezy RNA, DNA i białek (do tych procesów wykorzystuje ATP z cytoplazmy komórki żywiciela). Ciało siateczkowate (RB) jest większe, ma średnicę 0,51  $\mu\text{m}$ , jest formą wegetatywną i przypomina ciała siateczkowate innych chlamydii. Ta forma nie jest zakaźna dla komórek, może istnieć wyłącznie wewnątrzkomórkowo i rozmnażać się przez podział poprzeczny. W warunkach laboratoryjnych proces ten zachodzi w ciągu 24-72 godzin od zakażenia. W ten sposób w obrębie zakażonej komórki tworzą się charakterystyczne wtretoty (IB-inclusion body), które wkrótce doprowadzają do jej zniszczenia. Inkluzje tworzone przez szczepy gatunku *Ch. pneumoniae* są gęste, mają owalny kształt i nie zawierają glikogenu, dlatego nie wybarwiają się jodyną, ale są widoczne w barwieniu Giemsy. W obrębie wtretototy dochodzi do stopniowego przekształcania RB w EB, w tym czasie dochodzi do kondensacji cytoplazmy przy jednoczesnym zmniejszaniu jej rozmiarów. Wypełnione ciałkami podstawowymi wtretoty cytoplazmatyczne ulegają pęknięciu i następuje uwalnianie ciałek podstawowych zdolnych do zakażenia kolejnych zdrowych komórek gospodarza. W literaturze pojawiły się doniesienia na temat występowania dodatkowej postaci *Ch. pneumoniae* związanej z zakażeniem



przewlekłym tzw. ciałek atypowych (AB-aberrant body) o polimorficznym kształcie, które są 4-5 razy większe od RB, nieaktywne metabolicznie i nie rozmnażają się. Tworzą one natomiast atypowe wtręty o średnicy ok. 4  $\mu\text{m}$  (AI- aberrant inclusion), których liczba nie zwiększa się. Badania *in vitro* wykazały, że cykl rozwojowy chlamydii może być wstrzymany na etapie RB z powodu braku czynników odżywczych, obecności czynników przeciwbakteryjnych oraz odpowiedzi immunologicznej gospodarza np. syntezy interferonu gamma. *Ch. pneumoniae* jak wszystkie bakterie wewnątrzkomórkowe, potrzebuje do wzrostu tryptofanu. Natomiast interferon gamma (IF  $\gamma$ ) zwiększając ekspresję enzymu komórkowego 2,3-dwuoksygenazy indoloaminy indukującego rozkład tryptofanu, nie tylko zmniejszenia jego poziom w komórce, ale dodatkowo powoduje tworzenie form atypowych (AB, AI) *Ch. pneumoniae* i indukuje rozwój przewlekłego zakażenia (7, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 21, 22).



Ryc.3 Cykl rozwojowy chlamydii (wg.7 w modyfikacji własnej)

### 2.1.3 Budowa antygenowa i patogenezza zakażeń

Komórki chlamydialne we wszystkich stadiach rozwoju są otoczone podwójną błoną, co jest cechą charakterystyczną dla bakterii gram-ujemnych. Chociaż w przeciwieństwie do bakterii gram-ujemnych, *Chlamydia* nie posiadają warstwy peptydoglikanu w przestrzeni pomiędzy dwoma błonami (21, 22). Z drugiej strony sugeruje się obecność białka wiążącego penicylinę i mostków peptydowych analogicznych do występujących pomiędzy długimi łańcuchami polisacharydowymi peptydoglikanu (31). Sekwencja genu *Ch. trachomatis* wykazała obecność genów odpowiedzialnych za syntezę peptydoglikanu, składanie błony i cykl rozwojowy (60). Sugeruje się, że peptydoglikan jest potrzebny do podziału komórki ciała siateczkowatego (16).

Badania budowy antygenowej zapoczątkował Bedson, który wykazał u chlamydii antygeny grupowo (kompleks lipopolisacharydowy – LPS) i gatunkowo swoiste (termolabilne białko błony zewnętrznej - MOMP). Antygenem grupowo swoistym wspólnym dla wszystkich chlamydii jest kompleks lipopolisacharydowy (LPS). LPS jest powszechną endotoksyną u bakterii gram-ujemnych i zlokalizowany jest na powierzchni komórek *Chlamydia*, zarówno na ciałku podstawowym jak i na ciałku siateczkowatym. Chlamydiowy LPS jest strukturalnie podobny do szorstkiej postaci LPS znalezionej u enterobakterii, posiadając zarówno krzyżowo reagujące, jak i genowo specyficzne epitopy. W dodatku oprócz szorstkiej postaci LPS u chlamydii znaleziono również jego gładką postać. Budowa LPS nie jest identyczna u wszystkich gatunków chlamydii, i w porównaniu do LPS enterobakterii, chlamydialny LPS ma znacznie niższą aktywność endotoksyczną (16, 37, 46, 51).

W patogenezie zakażeń *Ch. pneumoniae* zasadniczą rolę odgrywają dwa antygeny białkowe: antygen gatunkowo swoisty czyli **główne białko zewnątrz błonowe** (MOMP) o masie 39,5 kDa i **białko szoku termicznego** (HSP60). Zewnętrzna błona zawiera białka nazywane białkami błony zewnętrznej (outer membrane proteins - Omp). Najważniejszym składnikiem ściany komórkowej ciała podstawowego jest główne białko zewnątrz błonowe (major outer membrane protein - MOMP) o masie cząsteczkowej od 38 do 42 kDa, zawierające około 60% białek błony zewnętrznej. MOMP zawiera serologicznie, podgatunkowo i gatunkowo swoiste epitopy, które mogą być zidentyfikowane przy pomocy przeciwciał monoklonalnych w teście mikroimmunofluorescencyjnym. MOMP odgrywa zasadniczą rolę w przemianie EB do wewnątrzkomórkowego, aktywnego metabolicznie RB. Antygen ten jest labilny, wrażliwy na działanie czynników fizycznych i chemicznych. MOMP jest zlokalizowany na powierzchni nie tylko *Ch. trachomatis* i *Ch. psittaci*, jak początkowo myślano, ale również na powierzchni *Ch. pneumoniae* i stanowi podstawę klasyfikacji chlamydii (18, 21, 22, 23, 24, 33, 45, 46, 51, 53).

Chlamydie zawierają także białka szoku termicznego (heat shock proteins – HSPs). Białka Hsp noszą nazwę opiekuńczych (ang. chaperones), należą do rodziny wszechobecnych, wysoce konserwatywnych białek, których synteza wzrasta w niekorzystnych dla komórki warunkach jak: szok termiczny, brak środków odżywczych itd. Geny kodujące Hsp10, Hsp60 i Hsp70 zostały sklonowane i zsekwencjonowane. Białka Hsp są wysoce konserwatywne w obrębie gatunków chlamydii, wliczając w to *Ch. pneumoniae*. Wszystkie trzy białka Hsp mogą być znalezione w kompleksach zewnętrznej błony zarówno ciałek podstawowych jak i ciałek siateczkowatych. Chlamydialne Hsp60 i Hsp70 są wysoce immunogenne w czasie pierwotnego zakażenia. Wykazano, że HSP 60 może aktywować ludzkie komórki związane z tworzeniem zmian miażdżycowych (komórki mięśni gładkich, komórki nabłonka) oraz makrofagi. Zakażone *Ch. pneumoniae* makrofagi wytwarzają m.in. metaloproteiny (enzymy odpowiedzialne za uszkodzenie tkanki łącznej w obrębie blaszki miażdżycowej) oraz TNF- $\alpha$  (cytokiny, która aktywuje wiele procesów istotnych w rozwoju miażdżycy) (20, 25, 30, 31, 34, 36, 44, 45, 46, 47, 49, 54, 55, 56, 60, 64, 99).

*Ch. pneumoniae* jest patogenna wyłącznie dla człowieka, bez rezerwuaru u ptaków i zwierząt. Zakażenie przenoszone jest prawdopodobnie drogą powietrzno-kropelkową, przy czym wykazano, że drobnoustrój ten może przetrwać kilka godzin w sztucznie przygotowanych aerozoluach. W temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  utrzymuje zakaźność przez wiele lat, natomiast w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  ginie po 3-12 godzinach. W literaturze opisano także przypadki zakażenia podczas przeprowadzania badań laboratoryjnych (16,26,31,49). Mimo częstego występowania swoistych dla tego drobnoustroju przeciwciał u ludzi na całym świecie, uważa się, że zakaźność tego patogenu jest niska. Wynika to prawdopodobnie z dwóch przyczyn: po pierwsze z niewielkiej liczby bakterii w górnych drogach oddechowych w czasie całego okresu zakażenia, po drugie z długiego okresu wylegania choroby wahającego się od trzech do czterech tygodni. Najczęstszymi miejscami rozwoju są zamknięte skupiska ludzi, np. szkoły, koszary, domy opieki lub instytucje publiczne (26, 27, 28, 29, 35, 49, 54, 58, 59, 65, 69).

Lista chorób wywoływanych przez *Ch. pneumoniae* jest długa i stale się powiększa. Zakażenie tym patogenem może mieć różne manifestacje i przebieg. Przypuszcza się, że większość zakażeń *Ch. pneumoniae* ma przebieg bezobjawowy (70-80%) lub skąpoobjawowy, natomiast bezobjawowe nosicielstwo *Ch. pneumoniae* występuje u 2-5% dorosłych i dzieci (43, 49, 54). Obecnie wiadomo, że *Ch. pneumoniae* jest czynnikiem etiologicznym: zapalenia płuc (10% wszystkich przypadków zapalenia płuc); zapalenia oskrzeli (ok. 5% wszystkich przypadków); zapalenia zatok, zapalenia ucha i gardła; zapalenia węzłów chłonnych śródpiersia; zapalenia mięśnia sercowego, zapalenia tęczówki; zapalenia wątro-

by; zapalenia mózgu lub mózdzku; zapalenia stawów (1, 27, 28, 32, 35, 38, 39, 41, 48, 49, 66, 67, 68).

Zakażenie *Ch. pneumoniae* może mieć charakter:

- **Zakażenia ostrego**, które przebiega łagodnie i u osób młodszych ma charakter samoograniczający się, bez towarzyszących schorzeń dodatkowych. Cięższy przebieg wymagający hospitalizacji oraz respiratoroterapii, nawet kończący się śmiercią, opisywano u starszych pacjentów, obarczonych dodatkowymi schorzeniami przewlekłymi lub wrodzonymi lub nabytymi zaburzeniami odporności (leczenie immunosupresyjne, AIDS).

Reakcja serologiczna charakterystyczna dla ostrego zakażenia obserwowano także w przebiegu **zakażenia bezobjawowego**.

- **Zakażenia nawracającego (reinfekcji)** - dosyć częstego, co więcej uważa się, że człowiek jest narażony na nie wielokrotnie w ciągu życia, a przebieg tych infekcji jest różny i zależy głównie od stanu immunologicznego pacjenta.
- **Zakażenia przewlekłego** - *Ch. pneumoniae* podobnie jak inne pasożyty wewnątrzkomórkowe (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Chlamydia trachomatis*) należy do drobnoustrojów zdolnych do wywoływania zakażeń przewlekłych (posiada zdolność przeżycia i namnażania się w komórkach zakażonego organizmu, z jednoczesnym osłabieniem odpowiedzi immunologicznej organizmu, głównie typu komórkowego) i związanych z tym długotrwałych procesów zapalnych. Dlatego też zakażenie *Ch. pneumoniae* jest coraz częściej wiązane z wieloma chorobami o etiologii niezakaźnej. Prowadzone są liczne badania wskazujące na udział tego mikroorganizmu w rozwoju: astmy, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, raka płuc, choroby wieńcowej, miażdżycy, rumienia guzowatego i zapalenia stawów, porażenia mózgowego, sarkoidozy, stwardnienia rozsianego, choroby Alzheimera i nowotworów.
- **Nosicielstwo** należy odróżniać od zakażenia bezobjawowego. U nosicieli, chociaż drobnoustrój może być wykrywany w materiale biologicznym, to w organizmie panuje „cisza serologiczna”. Nosiciele stanowią ok. 2-5% populacji (wyższy odsetek występuje u pracowników służby zdrowia), nie wykazują cech ostrego zakażenia, mogą jednak stanowić źródło zakażenia dla otoczenia. Natomiast w sprzyjających warunkach tj. przy spadku odporności, zakażenie może przybierać postać objawową. Charakterystyczne dla nosicielstwa *Ch. pneumoniae* jest powstawanie ciałek atypowych (AB-aberrant body) czyli odpowiednio zmodyfikowanych ciałek podstawowych, gotowych do rozwoju w sprzyjających warunkach. Ich powstawanie

jest następstwem nieprawidłowego leczenia antybiotykami, interferonem oraz diety ubogiej w tryptofan (38,49,54,57,61).

**Tabela 2. Objawy i rozpoznania towarzyszące zakażeniu *Ch. pneumoniae* u dzieci (wg.76)**

Diagnoza	Wiek		
	< 2 lat	2-4 lata	5-16 lat
Zapalenie nosogardła	14%	24%	35%
Zapalenie migdałków podniebiennych	0	0	57%
Zapalenie ucha środkowego	0	8%	33%
Pseudokrup	29%	67%	0
Obturacyjne zapalenie oskrzeli	6%	0	0
Zapalenie oskrzeli	0	0	75%
Zapalenie płuc	0	16%	21%
Astma oskrzelowa	7%	9%	9%

Jak wykazano w licznych badaniach *Ch. pneumoniae* ma zdolność zakażenia i namnażania się w ludzkich komórkach: komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich, monocytach/makrofagach pęcherzykowych i limfocytach *in vitro* (32, 34, 39, 40, 42, 52, 62, 63). Szerzenie się zakażenia wywołwanego przez *Ch. pneumoniae* zostało zbadane na modelu mysim. Po donosowej inokulacji, zakażenie *Ch. pneumoniae* rozprzestrzeniło się systematycznie w organizmie myszy, a drobnoustrój mógł być wyizolowany z płuc, śledziony i makrofagów otrzewnowych (63). Podobnie dożylna i podskórna inokulacja tego mikroorganizmu kończyły się szerzeniem się zakażenia. Jak wykazano nieco później także u zakażonych myszy, *Ch. pneumoniae* ma zdolność do systematycznego szerzenia w zakażonych makrofagach drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych (44).

Mechanizmy obronne gospodarza wydają się być niezdolne do eradykacji *Chlamydii* lub dostatecznej obrony przed reinfekcjami tym mikroorganizmem. Dlatego nawracające zakażenia chlamydiami są tak powszechne (26). Nawracające i przewlekłe zakażenia chlamydialne są związane z ciężkimi przypadkami, w których zasadniczą rolę odgrywały białka szoku termicznego - Hsps (36, 99). W chorobach o udokumentowanym związku z zakażeniem *Ch.pneumoniae*: w astmie (30, 170), miażdżycy (30, 36) i ostrym zapaleniu błony naczyniowej przedniego odcinka oka (29) stwierdzono obecność przeciwciał przeciw chlamydialnemu białku szoku termicznego 60 - Hsp60. Ponieważ Hsp60 jest wysoko konserwatywne, autoimmunologiczna odpowiedź w stosunku do ludzkiego Hsp60 może odgrywać zasadniczą w patogenezie chorób chlamydowych. Faktycznie przeciwciała przeciw chlamydialnemu Hsp60 wykazują reakcje krzyżowe z ludzkim Hsp60 (64), a oba ro-

dzaje przeciwciał przeciw chlamydialnemu i ludzkiemu Hsp60 zostały odnalezione w makrofagach zlokalizowanych w obrębie płytek miażdżycowych. Wykazano także, że Hsp60 *Ch. pneumoniae* pobudza tworzenie komórek piankowatych poprzez wywieranie niekorzystnego wpływu na gospodarkę lipidową - pobudzanie oksydacji LDL w monocytach (78). Rozpoznanie zakażenia dróg oddechowych wywołanego przez *Ch. pneumoniae* opiera się na:

- danych anamnestycznych (występowanie podobnych objawów wśród innych członków danej społeczności, zwykle przewlekły przebieg kliniczny)
- znajomości danych epidemiologicznych
- objawach klinicznych, które można podzielić na występujące **często (50-85%)**: suchy, męczący, krztuścopodobny kaszel, umiarkowana gorączka, surowiczy lub ropny katar, bóle gardła, chrypka, zmęczenie, **rzadziej (<30%)**: bóle brzucha, wymioty, bóle w klatce piersiowej, duszność, bóle ucha, bóle i zawroty głowy, bóle stawowo-mięśniowe,
- wynikach badania fizykalnego, które nie pozwalają w sposób jednoznaczny ustalić etiologii choroby, natomiast zaskakująca jest rozbieżność pomiędzy skąpyimi objawami osłuchowymi a nasilonymi zmianami zapalnymi stwierdzanymi w badaniu radiologicznym klatki piersiowej (1, 19, 35, 49, 54, 57, 61, 84).

### 2.1.4 Epidemiologia

*Ch. pneumoniae* jest powszechnie występującym patogenem oddechowym, chorobotwórczym wyłącznie dla człowieka. Wyniki prowadzonych na szeroką skalę badań epidemiologicznych sugerują, że niemal każdy w ciągu swego życia jest przynajmniej raz zakażony *Ch. pneumoniae* (65, 66, 70). Zakażenie tym drobnoustrojem szerzy się drogą powietrzno-kropelkową z człowieka na człowieka z pominięciem jakiegokolwiek rezerwuaru zwierzęcego, szczególnie łatwo o to w dużych skupiskach jak przedszkola, szkoły, jednostki wojskowe (67, 68, 69, 70, 74, 76, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84).

Zakażenie rozwija się powoli, a czas wylegania może trwać kilka tygodni, czyli znacznie dłużej niż w przypadku innych patogenów oddechowych (38). Czas rozwoju zakażenia w skupiskach ludzkich (np. rodzinach) może być jednak krótszy, jakkolwiek z rozpiętością od 5 do 18 dni (66). Przebieg zakażenia jest zwykle łagodny bądź bezobjawowy, najczęściej ma postać infekcji grypopodobnej, z długo utrzymującym się suchym kaszlem. Zakażenia *Ch. pneumoniae* dotyczą wszystkich grup wiekowych, chociaż większość autorów uważa je za stosunkowo rzadkie w grupie dzieci poniżej 5 roku życia. (61). W populacji dziecięcej pierwszy szczyt zachorowań obserwuje się w wieku szkolnym (5-10%/rok) (72). Niemniej jednak w niektórych obszarach zakażenia są powszechne już u dzieci w wieku od

1 do 4 roku życia (81, 82). Chorobowość wzrasta dramatycznie po 5 roku życia i do 20 roku życia szacuje się, że 50% ludzi ma serologiczne cechy przebytego zakażenia *Ch. pneumoniae*. Odsetek osób seropozytywnych zwiększa się z wiekiem, co wykazały badania przeprowadzone na ludziach zdrowych w Finlandii, obejmujących wszystkie grupy wiekowe, od dzieci 2 letnich do dorosłych powyżej 60 lat, przeciwciała dla *Ch. pneumoniae* wykryto u 6% dzieci w grupie wiekowej 2-4 lat, u 70% nastolatków, 50% osób w wieku 20-30 lat i 70-80% powyżej 30 roku życia. (111). Bezobjawowe nosicielstwo w jamie nosowo-gardłowej stwierdzano u 5% zdrowych dzieci i dorosłych. Serologiczne cechy przebytego zakażenia są porównywalne u obu płci do wieku młodzieńczego, ale wyższe wśród młodych mężczyzn niż kobiet (58). Oprócz płci męskiej, również palenie papierosów miało wpływ na częstsze zakażenia *Ch. pneumoniae* (71, 73, 75, 97).

Zakażenia *Ch. pneumoniae* pojawiają się corocznie w okresie jesienno-zimowym, ale obserwowano także warianty cyklicznych (występujących co 3-4 lata) epidemii zapaleń dróg oddechowych wywoływanych przez ten patogen. Szacuje się, że *Ch. pneumoniae* wywołuje 10% pozaszpitalnych zapaleń płuc i 5% zapaleń oskrzeli, co stawia ten patogen w czołowie drobnoustrojów wywołujących zakażenia dolnych dróg oddechowych (obok *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxiella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*) (58, 82). Jednak w okresach epidemii, odsetek pozaszpitalnych zapaleń płuc o tej etiologii może wzrastać do 45%. (49, 69, 74).

Pierwsze doniesienia o epidemiach wywołanych przez *Ch. pneumoniae* pochodzą z Finlandii i dotyczyły środowisk ludzi młodych, ogólnie zdrowych (dwa z środowisk studenckich z 1978 a cztery z garnizonów wojskowych w latach 1977–1978 i 1985–1987) (58, 69). Jak zostało wykazane *Ch. pneumoniae* wywoływała także endemie w Finlandii już w 1958 roku (73). Zakażenie tym patogenem szerzy się w każdej szerokości geograficznej, choć występują pewne różnice w tym zakresie, więcej zachorowań stwierdza się w krajach rozwijających się. Odmienności te próbuje się tłumaczyć większym zaludnieniem i gorszymi warunkami sanitarno-higienicznymi, które mogą sprzyjać transmisji patogenu pomiędzy ludźmi (49).

### 2.1.5 Diagnostyka

Rozpoznanie zakażeń wywołanych przez *Ch. pneumoniae* opiera się na:

- izolacji czynnika etiologicznego
- immunofluorescencji bezpośredniej (wykrywaniu antygenów EB)
- badaniach serologicznych
- metodach biologii molekularnej

Podstawą rozpoznania zakażenia jest wyizolowanie drobnoustroju z miejsca infekcji. W zakażeniach układu oddechowego *Ch. pneumoniae* izoluje się z materiału (wymazu) pobranego z: tylnej ściany gardła, spod nagłośni, z wydzieliny nadkrtaniowej, z popłuczyn oskrzelikowo-pęcherzykowych (BAL, bronchoalveolar lavage), z płynu z jamy opłucnej, z płwociny oraz z jamy nosowo-gardłowej (najczęściej stosowana procedura diagnostyczna u dzieci). Natomiast w zakażeniach układu krążenia obecność tego drobnoustroju stwierdzano w następujących materiałach pobranych podczas zabiegów operacyjnych i sekcji: płytkach miażdżycowych, tętnicy szyjnej, tętnicy biodrowej, komórkach śródbłonna, mięśniach gładkich tętnic. Chlamydie są bakteriami bardzo wrażliwymi na temperaturę. Rosną w temperaturze 37<sup>0</sup>C, a w temperaturze pokojowej giną po 1-2 godzinach. W temperaturze 4<sup>0</sup>C mogą być przechowywane przez 24 godziny (49, 92, 95).

Do izolacji i namnażania *Ch. pneumoniae*, drobnoustroju bytującego wewnątrzkomórkowo służy hodowla prowadzona:

- w pęcherzyku żółtkowym zarodka kurzego
- na różnych liniach komórkowych (HeLa, McCoy, BHK-21, HL, HEp-2) (49, 91, 107)

*Ch. pneumoniae* jest organizmem wybrednym, rozmnaża się wolno, w hodowli komórkowej tworzy charakterystyczne wtręty komórkowe (IB), które nie barwią się jodyną Jonesa, gdyż nie zawierają glikogenu. Natomiast do ich obrazowania stosuje się technikę immunofluorescencji bezpośredniej z użyciem znakowanych izotiocyanidem fluoresceiny (ITCF) swoistych przeciwciał monoklonalnych (49, 54, 102).

### **Hodowla *Chlamydia pneumoniae***

1. Pobranie materiału od pacjenta (wymaz nadkrtaniowy) na podłoże transportowe z dodatkiem antybiotyku (streptomycyna, wankomycyna, amfoteryczna B) zabezpieczającego przed kontaminacją bakteryjną
2. Hodowla na szkiełkach nakrywkowych; inkubacja w podłożu Eagle'a z 10% surowicą cielęcą. Po zakażeniu materiałem hodowlę wiruje się 1 godz. (3000obrotów/min) i dodaje się cykloheksymid w celu zahamowania aktywności mitotycznej komórek.
3. Inkubacja w 37<sup>0</sup>C przez 48 godzin
4. Utrwalanie hodowli acetonem



5. Inkubacja z koniugatem przeciwciał monoklonalnych znakowanych ITFC z dodatkiem błękitu Evansa (barwi komórki kontrastowo na kolor czerwony)
6. Oglądanie preparatów w mikroskopie fluorescencyjnym i porównywanie z kontrolą dodatnią i ujemną

**wynik dodatni**

obecność jasnozielono świecących dysków  
odpowiadających ciałkom wtretowym  
wewnątrz czerwonych komórek HEp-2

**wynik ujemny**

preparat zawiera tylko  
czerwono zabarwione komórki  
HEp-2 i brak ciałek wtretowych

Zgodnie z definicją Centers for Disease Control and Prevention (USA), za dodatnią można uznać tylko taką hodowlę *Ch. pneumoniae*, w której wykryto więcej niż jedną inkluzję szczepu w następujących po sobie dwóch pasażach (49, 54, 92, 103).

Do wykrywania antygenów ciała podstawowego (EB) *Ch. pneumoniae* stosuje się technikę immunofluorescencji bezpośredniej (np. test *Chlamydia pneumoniae* FITC Research) (49, 54, 109).

**Metoda immunofluorescencji bezpośredniej**

1. Utrwalanie rozmazu materiału (wymaz z nosogardła lub nadkrtaniowy) na szkiełku podstawowym
2. Nanoszenie na gotowy preparat konjugatu swoistych przeciwciał antychlamydowych znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC)
3. Inkubacja w wilgotnej komorze w temperaturze 37<sup>0</sup>C przez 15 minut
4. Przemycanie PBS
5. Oglądanie w mikroskopie fluorescencyjnym w powiększeniu x 400, a znalezione EB weryfikuje się w powiększeniu x 1000

**wynik dodatni**

obecność 1 lub więcej jasnozielono świecących  
punktów odpowiadających gruszkowatym  
ciałkom elementarnym na tle czerwonych  
komórek nabłonkowych

**wynik ujemny**

preparat zawiera tylko  
czerwono zabarwione komórki  
nabłonkowe

Podstawowym badaniem diagnostycznym w kierunku zakażeń *Ch. pneumoniae* jest obecnie wykrywanie swoistych przeciwciał w surowicy krwi pacjentów. Serologiczną diagnostykę tego zakażenia stosuje się głównie w diagnostyce ostrych zakażeń oddechowych oraz w badaniach oceniających seroepidemiologiczny związek zakażenia *Ch. pneumoniae* z astmą, miażdżycą i innymi chorobami przewlekłymi. Obecnie badania serologiczne wykonuje się przy użyciu trzech metod diagnostycznych:

- odczynu mikroimmunofluorescencji MIF
- odczynu wiązania dopełniacza OWD
- odczynu immunoenzymatycznego ELISA

Metodę referencyjną (tzw. "złoty standard") w badaniach serologicznych stanowi **mikroimmunofluorescencja pośrednia** (MIF), w której jako antygen wykorzystuje się formalizowane EB *Ch. pneumoniae*, pozbawione rodzajowo swoistego lipopolisacharydu.

MIF wykrywa zarówno swoiste IgG, jak i IgM oraz IgA. Oznaczane metodą MIF przeciwciała klasy IgM pojawiają się około 3 tygodnia od początku choroby, a klasy IgG po 6 - tygodniach. Oznaczanie swoistych przeciwciał klasy IgA może być przydatne w diagnostyce przewlekłych stanów zapalnych układu oddechowego i naczyniowego (np. astmy, sarkoidozy, miażdżycy tętnic). Odczyn MIF, opracowany przez Wanga i wsp. w 1970 roku, początkowo do celów serologicznych rozpoznawania zakażeń *Ch. trachomatis*, okazał się czułym i swoistym testem dla diagnostyki wszystkich chlamydii. Prawidłowo wykonany nie daje reakcji krzyżowych między *Ch. pneumoniae* i *Ch. trachomatis* (49, 54, 90, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101).

Oprócz odczynu MIF do badań serologicznych może też być użyty **odczyn wiązania dopełniacza (OWD)**. OWD nie jest jednak odczynem swoistym i może wypaść dodatnio w zakażeniach wywołanych różnymi innymi typami chlamydiami, wykrywa on bowiem przeciwciała przeciw wspólnym rodzajowo lipopolisacharydom. Ponadto OWD jest technicznie trudny do wykonania i wymaga starannej standaryzacji, dlatego został zastąpiony przez inne bardziej czułe i swoiste badania serologiczne (49, 54).

Do wykrywania swoistych przeciwciał należących do trzech klas immunoglobulin służą także **metody immunoenzymatyczne**. W odczynie ELISA do wykrywania przeciwciał klas IgA, IgM i IgG przeciw *Ch. pneumoniae* opłaszczą się swoistym przeciwciałem (kompleks białek zewnątrz błonowych zawierający epitopy swoiste tylko dla *Ch. pneumoniae*, rekombinowany fragment LPS) dołki w płytce mikrotitracyjnej do odczynu ELISA. Następnie dodaje się próbkę materiału od chorego i wówczas dochodzi do wiązania swoistego przeciwciała z antygenem. Płytkę przepłukuje się i dodaje immunoglobulinę antyludzką, znakowaną enzymem, ponownie przepłukuje się i dodaje substrat enzymu. W wy-

niku reakcji między enzymem a substratem następuje zmiana barwy, która wskazuje, że doszło do interakcji między antygenem a przeciwciałem. Gęstość optyczną barwnika mierzy się za pomocą odpowiedniego spektrofotometrycznego czytnika do odczynu ELISA.

Do każdej serii oznaczeń zostaje włączona kontrola dodatnia (surowica zawierająca przeciwciała dla *Ch. pneumoniae*) i kontrola ujemna (surowica nie wykazująca reakcji z antygenem *Ch. pneumoniae*). Wyniki wyraża się jako indeks, będący ilorazem absorbancji próbki badanej i wartości granicznej. Czulość i swoistość tej metody zależą jednak od rodzaju wykorzystanego w nich antygeny *Ch. pneumoniae*, co utrudnia porównywalność otrzymanych wyników badań (85, 86, 105, 106, 108, 110, 111).

Zastosowanie **metody PCR** do wykrywania DNA *Ch. pneumoniae* pozwoliło na częstszą identyfikację zakażeń tym drobnoustrojem. Zidentyfikowano dotychczas kilka obszarów genomowego DNA tej bakterii, które uznano za swoiste dla różnicującej i identyfikującej amplifikacji. Najczęściej stosowane są startery dla regionu obejmującego gen kodujący główne białko błony zewnętrznej MOMP (333bp) lub odcinka Pst I (437 bp) oraz dla podjednostki 16S rRNA. Do identyfikacji i wizualizacji produktów amplifikacji stosuje się różne techniki, które mimo swej dużej czulości mają pewne ograniczenia wynikające z obecności w niektórych materiałach inhibitorów Taq DNA polimerazy, kontaminacji lub niewłaściwego oczyszczenia DNA. Materiały do badań obecności genomu *Ch. pneumoniae* stanowią wymazy z gardła lub nosa, płyn z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, płwocina, a także blaszki miazdżycowe.

Wydaje się, że optymalne wyniki można uzyskać, stosując równocześnie metody serologiczne określające miano przeciwciał przeciwko *Ch. pneumoniae* i PCR (49, 54, 87, 88, 89, 98, 104, 106, 112)

### 2.1.6 Leczenie zakażeń wywołanych przez *Ch.pneumoniae*

Zakażenia *Ch. pneumoniae* w większości przypadków przebiegają skąpo- lub bezobjawowo. W takich przypadkach pacjent przeważnie nie zgłasza się do lekarza i nie jest leczony. Po kontakcie z drobnoustroju z organizmem człowieka, możliwe jest:

1. wyeliminowanie patogenu (wyniki badań serologicznych wskazują na przebyte zakażenie, ale nie wykrywa się patogenu w materiale biologicznym)
2. przejście w stan nosicielstwa (wyniki badań serologicznych wskazują na brak kontaktu z patogenem, natomiast drobnoustrój jest wykrywany w materiale biologicznym pochodzącym od chorego, choć nie występują objawy kliniczne zakażenia).

Leczenie nosicielstwa jest kontrowersyjne a większość badaczy problemu skłania się do jego zaniechania.

Leczenia wymagają natomiast: infekcja ostra, reinfekcja lub zaostrzenie infekcji przewlekłej. Najstarszymi informacjami dotyczącymi antybiotykoterapii chlamydioz było stosowanie dużych dawek penicyliny w ornitozie. Po ustaleniu biologii chlamydii wyodrębniono te leki, które blokują rozmnażanie chlamydii przenikając do wnętrza zakażonych komórek. Testowano różne antybiotyki w poszukiwaniu właściwego leczenia zakażeń wywołanych przez *Ch. pneumoniae*. Antybiotyki makrolidowe (azytromycyna i klarytromycyna) wykazały wysoką aktywnością przeciwchlamydiovą w badaniach *in vitro*. Preparaty makrolidowe są, zatem antybiotykami z wyboru w leczeniu zakażeń wywołanych patogenami atypowymi, w tym także *Ch.pneumoniae*, w każdej grupie wiekowej ze względu na:

- szerokie spektrum przeciwbakteryjne
- korzystną farmakokinetykę
- nieliczne działania niepożądane
- unikalne działanie przeciwzapalne
- nieliczne przeciwwskazania (114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 123, 124, 128, 129).

Również kilka nowych fluorochinolonów (perfloksacyna, ciprofloksacyna, moxifloksacyna) i ketolidów (nowa klasa makrolidów - telithromycyna) okazało się być efektywnymi w leczeniu zakażeń chlamydiovych (121, 122, 125). Drobnoustroj jest niewrażliwy *in vitro* na leki z grupy sulfonamidów, penicyliny i ampicylinę. Kliniczne obserwacje wykazały, że objawy zakażenia *Ch. pneumoniae* często nawracają po krótkich lub konwencjonalnych (7-10 dniowych) kursach antybiotykoterapii. Niewłaściwa antybiotykoterapia prowadzi do braku eliminacji (eradykacji) drobnoustroju z organizmu. Leczenie zakażenia *Ch. pneumoniae* powinno uwzględniać morfologię cyklu rozwojowego tego mikroorganizmu, dlatego zaleca się intensywną długoterminową antybiotykoterapię trwającą 2-3 tygodnie w przypadku zakażenia ostrego i 4 do 6 tygodniową antybiotykoterapię w zakażeniu przewlekłym wraz ze stosowaniem diety ubogiej w tryptofan (mleko, ziemniaki, dynia, pszenica mielona, natka pietruszki, warzywa kapustne, banany, pestki słonecznika) (114, 118, 120). Powszechność i podstępna natura zakażenia *Ch. pneumoniae* czyni jego profilaktykę bardzo trudną do osiągnięcia, dlatego rozwój szczepionek antychlamydiovych wydaje się być bardzo istotnym celem badawczym. Od kilku lat trwają prace nad szczepionką TWARVAX przeciw *Ch. pneumoniae*. Jednak pomimo prób wykorzystania różnych antygenów (LPS, główne białko błony zewnętrznej, białko błony zewnętrznej bogate w cysterinę, a także białko szoku cieplnego 60) jej immunogenność, a przede wszystkim czas działania, ochronnego są jak dotychczas niezadowalające (113, 126, 127).

## 2.2. Astma oskrzelowa

### 2.2.1 Definicja i klasyfikacja

Astma oskrzelowa najczęstszą przewlekłą chorobą układu oddechowego. Definicja tej przewlekłej choroby zmieniała się w miarę upływu czasu. Początkowo uważano astmę oskrzelową za chorobę napadową, zaburzającą jedynie drożność drzewa oddechowego (na skutek odwracalnego skurczu mięśniówki, co klinicznie objawiało się napadami kaszlu, duszności i/lub świszczącego oddechu). Dopiero w 1991 roku grupa międzynarodowych ekspertów opracowała raport na temat rozpoznawania i leczenia astmy, opublikowany następnie przez *National Heart, Lung and Blood Institute, National Institute of Health*, w którym po raz pierwszy zdefiniowano astmę jako przewlekłą chorobę zapalną dróg oddechowych, w której biorą udział liczne komórki zapalne, w tym mastocyty i eozynofile. W 1995 roku w definicji astmy zaakcentowano rolę limfocytów, a także nawrotowość i zmienność epizodów obturacji oskrzeli. Ostatnia, obowiązująca obecnie definicja astmy oskrzelowej pochodzi z Raportu GINA 2002 uaktualnionego w 2003 roku.

Astma jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych, w której uczestniczy wiele komórek zapalnych i substancji przez nich uwalnianych. Przewlekłe zapalenie jest przyczyną nadreaktywności oskrzeli, prowadzącej do nawracających epizodów świszczącego oddechu, duszności, ściskania w klatce piersiowej i kaszlu, występujących szczególnie w nocy lub nad ranem. Epizodom tym zwykle towarzyszy rozłana obturacji oskrzeli o zmiennym nasileniu, często ustępująca samoistnie lub pod wpływem leczenia (130, 131, 132, 133, 134, 135).

### 2.2.2. Epidemiologia

Astma oskrzelowa jest problemem zdrowotnym wieku dziecięcego, stwarzającym aktualnie coraz więcej problemów diagnostycznych i terapeutycznych w populacji. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest lawinowy wzrost częstości występowania tej choroby (132, 137).

Częstość występowania oraz stopień nasilenia choroby różnią się w zależności od badanej populacji, stosowanych kryteriów rozpoznawczych oraz sposobu zbierania danych. W Polsce pomimo, że choroba ta wydaje się być niedodiagnozowaną ocenia się, iż ok. 10,1% dzieci do 14 roku życia ma typowe objawy astmy oskrzelowej, co wykazano w ramach programu badawczego KBN („Epidemiologia astmy oskrzelowej, kataru sezonowego i całorocznego, wyprysku atopowego i kontaktowego oraz alergii na leki w populacji Polski, z uwzględnieniem stopnia zanieczyszczeń środowiska.” KBN 4 PO5B/97/13).

Według badań epidemiologicznych prowadzonych po patronatem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego w Polsce w 2000 roku wśród dzieci i populacji do-

rosłych wykazano, iż z powodu astmy oskrzelowej cierpi w naszym kraju ponad 8,6% dzieci oraz 5,4% dorosłych. (135, 136).

Wzrost liczby przypadków zachorowań na astmę jest problemem ogólnoswiatowym. Wyniki międzynarodowego, wielośrodkowego ankietowego badania (**ISAAC - The International Study of Astma and Allergies in Childhood**) przeprowadzonego w latach 1993-95 a następnie w latach 2001-2002 wykazały, że w populacji całego globu astma występuje u 7,2 % dzieci w wieku 6-7 lat i 11,3 % dzieci w wieku 13-15 lat (132, 136, 137, 138). Także wyniki badań polskiej grupy, biorącej udział w III fazie badania ISAAC przeprowadzonego wśród dzieci w wieku 6-7 lat i 13-14 lat w Poznaniu i Krakowie pokazały silny trend wzrostowy na przestrzeni ostatnich 6-7 lat, w całkowitej prevalencji astmy oskrzelowej w obu grupach wiekowych (138). Całkowita śmiertelność z powodu astmy nie obniżyła się istotnie, mimo postępów w rozpoznawaniu i leczeniu tej choroby. Jednakże w stosunku do chorych przyjmowanych do szpitala z powodu astmy liczba zgonów zmniejszyła się i wynosi poniżej 1/100000 osób (139, 140).

### **2.2.3 Czynniki ryzyka**

Skurcz oskrzeli w przebiegu astmy oskrzelowej powstaje najczęściej w wyniku kontaktu z alergenem. Przyczyną napadu duszności mogą być również czynniki niealergiczne, takie jak: wysiłek, zakażenia, zimne powietrze lub czynniki emocjonalne. Spośród alergenów najważniejszą rolę w rozwoju astmy odgrywiają alergeny wziewne (alergeny kurzu domowego, alergeny pyłków roślin, pleśni, antygeny zwierzęce), znacznie rzadziej czynnikiem prowokującym do reakcji alergicznej są alergeny pokarmowe lub leki (137, 139, 141).

#### **▪ Czynniki genetyczne**

Bardzo szczegółowe badania dużych grup ludności zmieniły nieco pogląd na temat dziedziczenia astmy, kładąc większy akcent na element wpływu środowiska. W badaniach tych przeanalizowano problem dziedziczenia atopii i astmy, które okazały się być zjawiskami rozdzielnymi. Astma nie dziedziczy się w prostym mendelowskim układzie. Badania nad genetyką tej choroby znajdują się w centrum zainteresowania badaczy na całym świecie. W sumie analizowano 19 regionów chromosomalnych, poszukując polimorfizmu związanego z astmą, ale mimo to jeszcze daleko do wyciągnięcia wniosków o charakterze praktycznym (144, 150).

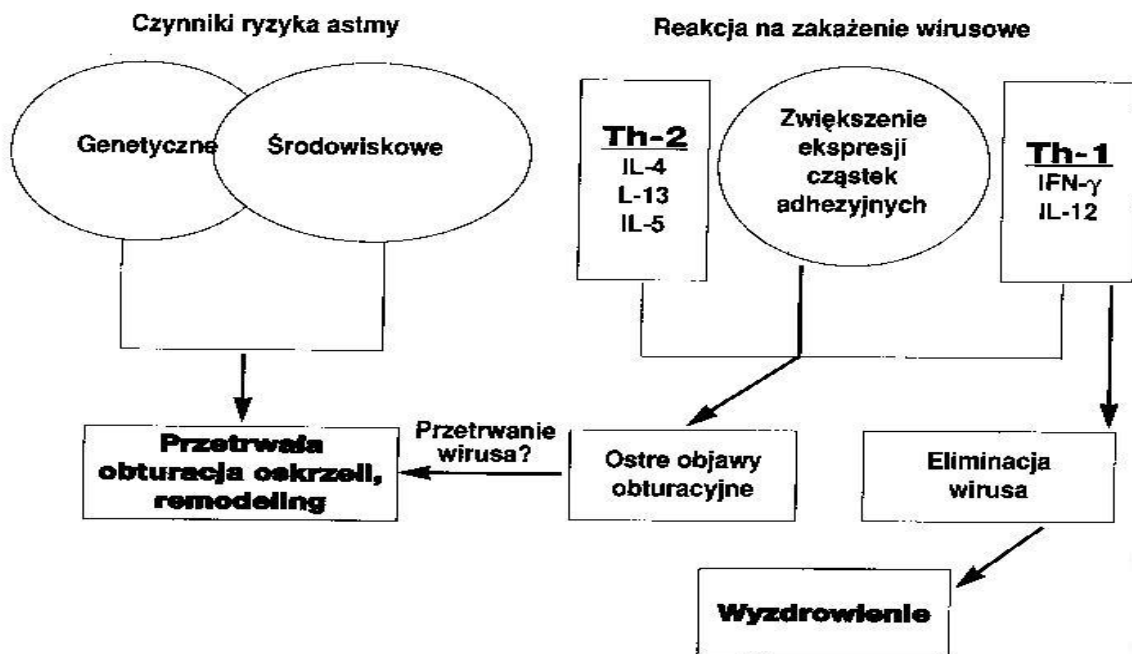
#### **▪ Czynniki środowiskowe**

Wielokrotnie opisywano epizody zaostrzeń astmy podczas epizodów nagłego zanieczyszczenia środowiska, głównie dwutlenkiem siarki – „New Orleans asthma”, „Tokio - Yokohama asthma”. Odnotowano także proporcjonalne do stopnia zanieczyszczenia powietrza zwiększenie liczby przyjęć do szpitala chorych na astmę z powodu zaostrzenia objawów

choroby. Nie wykazano jednak w sposób jednoznaczny wpływu zanieczyszczeń powietrza na powstawanie astmy. Wiadomo natomiast, że czynnikami wyzwalającymi zaostrzenia astmy są: zmiany temperatury i ciśnienia atmosferycznego (np. ekspozycja na zimno, mgłę), zanieczyszczenie powietrza (dym tytoniowy, dwutlenek siarki), dodatki do pokarmów (konserwanty), czynniki emocjonalne (stres), niektóre leki (np. NLPZ, beta-blokery) i inne. (137, 139, 142, 144).

#### 2.2.4 Astma oskrzelowa a zakażenia układu oddechowego.

Znaczenie zakażeń wirusowych i bakteryjnych w patogenezie astmy oskrzelowej jest bardzo duże. Epizody infekcji u dzieci z astmą oskrzelową są stwierdzane 10-krotnie częściej niż u dzieci z grupy kontrolnej. Niewątpliwie największe znaczenie należy przypisać infekcjom wywoływanym przez drobnoustroje wewnątrzkomórkowe, głównie wirusy (RSV, wirusy grypy, paragrypy, rynowirusy, adenowirusy, koronawirusy, enterowirusy, CMV), przy czym rodzaj patogenu przyczyniającego się do rozwoju choroby zależy od pory roku oraz wieku pacjenta. Przebycie w dzieciństwie zapalenia oskrzelików (*bronchiolitis*) lub obturacyjnego zapalenia oskrzeli może indukować przewlekły stan zapalny, będący przyczyną nieswoistej nadreaktywności oskrzeli, na bazie której rozwija się astma oskrzelowa (143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 163).



Ryc. 4 Możliwe zależności pomiędzy zakażeniem wirusowym, astmą i alergizacją

(wg. 178)

Jednym z wewnątrzkomórkowych patogenów w stosunku, do którego próbuje się udowodnić związek przyczynowo-skutkowy z rozwojem astmy oskrzelowej, jest przebycie zakażenia *Chlamydia pneumoniae* (49).

Po raz pierwszy zwrócono uwagę na możliwość istnienia takiej zależności w 1989 r (4). Hipotezę tę potwierdziło wykazanie zarówno na modelu zwierzęcym jak i u ludzi możliwości wywoływania w przebiegu zakażenia *Ch. pneumoniae* przewlekłego stanu zapalnego dróg oddechowych (22, 23, 24, 63). Opisano przykłady pełnoobjawowej astmy, którą poprzedzało ostre zakażenie *Ch. pneumoniae*. Kolejnym dowodem był przypadek labo-rantki przypadkowo zakażonej tym drobnoustrojem, u której również początkowo rozwinęło się zapalenie płuc, a następnie astma oskrzelowa (1,49). Do 1999 roku związek zakażenia wywołanego przez *Ch. pneumoniae* i rozwoju astmy oskrzelowej lub przewlekłej obturacyjnej choroby płuc stwierdzono opisując 8 przypadków klinicznych, gdzie wykazano, że w przebiegu zakażenia dolnych dróg oddechowych wywołanych przez ten patogen występuje:

- świszczący oddech u pacjentów nieobciążonych schorzeniami alergicznymi
- zaostrzenie zdiagnozowanej wcześniej astmy oskrzelowej
- pierwszy epizod rozpoznany jako astma oskrzelowa
- poprawa po leczeniu makrolidami u pacjentów z astmą oskrzelową w czasie zaostrzenia.

Obserwacje te potwierdziły wyniki 15 z 18 badań klinicznych obejmujących badanych z astmą oskrzelową, łącznie ponad 4000 pacjentów. Uzyskane wyniki wieloośrodkowych badań pozwoliły ustalić przyczynową rolę *Ch. pneumoniae* w epizodach zaostrzeń astmy oskrzelowej u 5-23% pacjentów. Zaobserwowano także, że objawy spastycznego zapalenia oskrzeli, a następnie astmy oskrzelowej na podłożu infekcyjnym (w przebiegu zakażenia *Ch. pneumoniae*) występują częściej u dorosłych niż u dzieci. Przeciwciała świadczące o przebyciu ostrej lub przewlekłej infekcji *Ch. pneumoniae* stwierdzane są w surowicy 25-50% dzieci z astmą oskrzelową powyżej 5 roku życia, podczas gdy u dorosłych odsetki te sięgają blisko 100% (49).

Słuszna wydaje się również hipoteza Hahn'a i wsp., że wraz z wiekiem maleje ryzyko rozwoju astmy atopowej, a rośnie ryzyko astmy infekcyjnej. Hahn i wsp. opisali występowanie świszczącego oddechu, obturacyjnego zapalenia oskrzeli wklajającego astmę oskrzelową lub poprzedzającego rozwój astmy oskrzelowej jedynie u pacjentów z przeciwciałami antychlamydialnym w klasie IgG i IgA (nie stwierdzano przeciwciał w klasie IgM), a taki profil serologiczny charakterystyczny jest dla zakażenia przewlekłego. Sugerować to może, że powtórne zakażenie *Ch. pneumoniae* (reinfekcja) jest groźniejsze w skutkach (obarczone większym ryzykiem rozwoju przewlekłego stanu zapalnego kluczowego do rozpoznania astmy oskrzelowej) niż zakażenie pierwotne (19, 28, 44, 151, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172).



Wspólnym mechanizmem w przebiegu, którego zarówno wirusy, jak i *Ch. pneumoniae*, mogą wywoływać i zaostrzać astmę oskrzelową, jest rozwój nieswoistej nadreaktywności oskrzeli na podłożu:

- anatomicznego zwężenia dróg oddechowych (uszkodzone komórki nabłonka produkują i uwalniają szereg mediatorów reakcji zapalnej podtrzymujących proces zapalny (w tym IL- 2, 4, 5, 6, 8, 16; GM-CSF, prostaglandyny (zwłaszcza PGD<sub>2</sub>), leukotrieny (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTF<sub>4</sub>), fosfatydylocholina (PAF), histamina, bradykinina, tlenek azotu), a po złuszczeniu komórki te zamykają światło drobnych oskrzeli, utrudniając przepływ powietrza),
- nasilania gotowości oskrzeli do skurczu poprzez:
  - uszkodzenie nabłonka oddechowego z jego złuszczeniem, co w konsekwencji daje zwiększenie przylegania i przechodzenia alergenów z otoczenia, odsłonięcia receptorów kaszlowych nerwu błędnego oraz aktywację włókien aferentnych tego nerwu,
  - zmniejszenie reaktywności receptorów beta-adrenergicznych, oraz odsłonięcie i podrażnienie zakończeń bezmielinowych C układu nieadrenergicznego i niecholinergicznego,
- wpływu na układ immunologiczny poprzez pobudzenie wytwarzania swoistych przeciwciał klasy IgE, zwiększone uwalnianie histaminy zależne od IgE, uwalnianie histaminy, kinin i LTC<sub>4</sub> modulowane interferonem, zmienioną regulację wytwarzania cytokin przez limfocyty T pomocnicze, wpływ na adhezję komórek (poprzez zwiększenie wytwarzania cytokin takich jak IL-6, IL-8, GM-CSF, które spełniają rolę czynników wzbudzających i aktywujących komórki zapalne ściany dróg oddechowych), rozwój późnej fazy natychmiastowej reakcji alergicznej (LAR).

Wykazano szereg analogii pomiędzy powstawaniem nieswoistej nadreaktywności oskrzeli w przebiegu zakażeń wirusowych oraz zakażeń wywołanych przez *Ch. pneumoniae*, podczas których dochodzi do:

- uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych i odsłonięcia zakończeń nerwowych, co uwrażliwia je na czynniki drażniące (w tym alergeny)
- unieruchomienie i zniszczenie aparatu rzęskowego tzw. ciliostaza (co utrudnia lub uniemożliwia usunięcie czynników drażniących)
- indukowanie wytwarzania mediatorów reakcji zapalnej (TNF , IL-1 , IL-6)
- zaburzenia funkcji makrofagów
- wytwarzania białek szoku termicznego (*heat shock proteins*), które zwiększają przepuszczalność śródbłonka i nasilają proces zapalny (173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189).

Innym, ważnym „kamieniem milowym” na drodze dowodowej koncepcji chlamydiowej w astmie dziecięcej było badanie Nagy’ego i wsp., którzy w bardzo dobrze udokumentowanej pracy (analiza genetyczna ponad 300 dzieci) wykazali, że znamienne częstsze występowanie dodatnich poziomów chlamydiowych przeciwciał IgG dotyczy dzieci będących nosicielami różnych wariantów alleli kodujących lektynę wiążącą mannozę (MBL-mannose binding lectin), głównego czynnika drogi lektynowej układu dopełniacza, która wraz z drogą alternatywną zapoczątkowują reakcję odpornościową bezpośrednio po wniknięciu patogenu do organizmu jeszcze przed wytworzeniem się swoistych przeciwciał. Ponadto udowodnili, iż u dzieci zarażonych *Ch.pneumoniae* (zwłaszcza z zakażeniem przewlekłym i nawrotowym) z różnymi wariantami alleli kodujących MBL istnieje znacznie wyższe ryzyko rozwoju astmy (95% CI, 1,75-14,35, p=0,01), niż u dzieci z normalnym genotypem MBL (184).

### 2.2.5 Diagnostyka i leczenie astmy oskrzelowej

Prawidłowo zebrany **wywiad** oraz **badanie przedmiotowe** dziecka w trakcie zaostrzenia astmy (duszność wydechowa, zaciąganie przestrzeni międzyżebrowych, utrudniony oddech, wdechowe ustawienie klatki piersiowej, przyspieszenie i spłylenie oddechów, przedłużenie fazy wydechowej, świsty, fuczenia) pozwalają potwierdzić rozpoznanie. W okresie między zaostrzeniami choroby zwykle nie stwierdza się żadnych objawów klinicznych, chociaż osłuchiwanie dziecka w trakcie forsownego wydechu może ujawniać wydłużenie fazy wydechowej i świsty.

U każdego pacjenta z epizodami obturacji dolnych dróg oddechowych i świszczącego oddechu, zwłaszcza u małych dzieci, przed ostatecznym rozpoznaniem astmy musi się przeprowadzić **diagnostykę różnicową (tab. 3)**.

**Tabela 3. Przyczyny świszczącego oddechu u dzieci w zależności od wieku**

Wiek dziecka	Przyczyny
Noworodki, niemowlęta i dzieci do 3 roku życia	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ bronchiolitis</li> <li>▪ odpływ żołądkowo-przełykowy</li> <li>▪ wiotkość krtani i tchawicy</li> <li>▪ dysplazja oskrzelowo-płucna</li> <li>▪ przetoka tchawiczo-przełykowa</li> <li>▪ obturacyjne zapalenie oskrzeli</li> <li>▪ pierścień naczyniowy</li> <li>▪ wrodzone wady serca</li> </ul>
Niezależnie od wieku	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ astma oskrzelowa</li> <li>▪ aspiracja ciała obcego</li> <li>▪ mukowiscydoza</li> <li>▪ pierwotna dysfunkcja rzęsek nabłonka oddechowego</li> <li>▪ guzy śródpiersia, płuc</li> <li>▪ przepukliny przeponowe</li> <li>▪ niewydolność lewokomorowa</li> <li>▪ dysfunkcja strun głosowych</li> </ul>

**Badania czynnościowe układu oddechowego** są wykorzystywane w rozpoznawaniu, a wraz z pomiarami **dobowej zmienności PEF** również w monitorowaniu przebiegu oraz leczenia astmy.

Ciężkość astmy ocenia się na podstawie nasilenia objawów klinicznych, zużycia  $\beta_2$ -sympatykomimetyków krótkodziałających, spirometrycznych wskaźników drożności oskrzeli (PEF, FEV<sub>1</sub>) oraz zmienności dobowej PEF.

Prawidłowa ocena stopnia zaawansowania choroby umożliwia odpowiednie leczenie, które ma na celu zminimalizowanie objawów astmy oskrzelowej, w tym ustąpienie napadów nocnych, zmniejszenia częstości epizodów duszności lub suchego kaszlu, wyeliminowanie napadów zagrażających życiu.

Uwzględniając obowiązującą definicję astmy oskrzelowej, głównym celem jej leczenia jest ograniczenie (wygaszenie) procesu zapalnego i zmniejszenie stopnia nadreaktywności oskrzeli. Wykazano bowiem, że nawet w astmie o łagodnym przebiegu klinicznym w błonie śluzowej oskrzeli występują zmiany zapalne, które nie leczone mogą prowadzić do przebudowy ściany oskrzeli tzw. remodelingu.

W leczeniu astmy podaje się tzw. **leki objawowe**, stosowane doraźnie w zaostrzeniach choroby i tzw. **leki kontrolujące**, stosowane przewlekłe. Leczenie astmy jest leczeniem kompleksowym i powinno obejmować:

- ograniczenie do minimum lub całkowite wyeliminowanie kontaktu z alergenem odpowiedzialnym za zaostrzenia choroby
- **przewlekłe leczenie** przeciwzapalne
- **leczenie objawowe** tzn. znoszące skurcz mięśni gładkich oskrzeli
- **edukację** chorego i jego rodziny

Według GINA oprócz regularnego stosowania leków kontrolujących przebieg choroby, stosuje się doraźnie szybko działający  $\beta_2$  – mimetyk wziewny, ale nie powinno się go stosować częściej niż 3-4 razy na dobę. Po osiągnięciu i utrzymaniu kontroli astmy przez co najmniej 3 miesiące należy spróbować stopniowo zmniejszać intensywność leczenia podtrzymującego w celu ustalenia minimalnego zapotrzebowania na leki, koniecznego do kontrolowania choroby. Poprawę uzyskuje się zwykle w ciągu miesiąca od rozpoczęcia leczenia. W przypadku braku poprawy ocenić technikę i regularność przyjmowania leku oraz unikanie czynników ryzyka, a następnie zwiększyć intensywność leczenia. Ciężkie napady mogą występować u chorego z każdym stopniem ciężkości astmy. Skonsultować się z pulmonologiem dziecięcym przy braku reakcji na leczenie lub konieczności zastosowania stopnia 3 lub 4 (130, 131, 144, 149, 190, 191, 192, 193, 194).

W 1989 roku Fryden i wsp. jako pierwsi opisali możliwość pojawienia się astmy po zakażeniu *Ch. pneumoniae* u dorosłych (161). W dwa lata potem, w 1991 roku Hahn i wsp. po raz pierwszy donieśli o silnej korelacji między udowodnionym serologicznie zakażeniem *Ch. pneumoniae* a nagłym zaostrzeniem przebiegu astmy młodocianych oraz o złagodzeniu objawów lub uzyskaniu remisji tej choroby u badanych pacjentów po leczeniu makrolidami (164). Na podstawie licznych badań klinicznych, jakie przeprowadzono od tej pory wskazano kilka mechanizmów występujących w zakażeniu *Ch. pneumoniae*, które mogą prowadzić do rozwoju astmy oskrzelowej lub doprowadzać do jej zaostrzeń. Wykazano m.in. zdolność chlamydii do uszkodzania nabłonka dróg oddechowych, unieruchamiania i destrukcji aparatu rzęskowego, co poprzez wzrost ekspozycji położonych podnabłonkowo zakończeń nerwowych na substancje drażniące i alergeny, nasila nadreaktywność oskrzeli (165, 166, 167, 174, 178, 179, 186).

Ponadto Chlamydie zaburzają funkcjonowanie makrofagów, nasilając zależną od IgE odpowiedź alergiczną na wziewne alergeny, z którymi osoba miała kontakt. Zakażenie *Ch. pneumoniae* toruje również drogę dla dodatkowych zakażeń (wirusowych i bakteryjnych - *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae* i in.) przez co może zapoczątkowywać zapalenie płuc, które jest znaczącym czynnikiem ryzyka w rozwoju astmy oskrzelowej u dzieci (49, 54, 182, 183, 184, 187, 188, 189).

W świetle powyższych danych wydaje się, że identyfikacja zakaźnego czynnika etiologicznego zaostrzeń astmy oskrzelowej może w przyszłości przyczynić się do zastosowania nowych strategii leczenia tej przewlekłej choroby.

### 3. Cel pracy

Celem prezentowanego badania jest weryfikacja następujących hipotez zerowych:

1. Nie ma różnicy w częstości ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* (określonego serologicznie) pomiędzy grupą dzieci chorych na astmę oskrzelową w wieku 7 do 15 lat a grupą dzieci bez tego schorzenia.
2. Nie ma związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy oskrzelowej i występowaniem kolejnych zaostrzeń choroby u dziecka z ostrym lub przewlekłym zakażeniem *Ch. pneumoniae*.

## 4. Materiał i metoda

### 4.1 Grupy badane

#### I. Grupa dzieci chorych na astmę oskrzelową

Badaniem objęto grupę 70 dzieci (w tym 26 dziewczynek i 44 chłopców) chorych na astmę oskrzelową o różnym stopniu zaawansowania choroby, pozostających w stałej opiece Poradni Pulmonologicznej i Alergologicznej USD, które zgłosiły się na wizytę kontrolną w okresie od 01.10.2002 do 01.05.2003 i spełniały wszystkie **kryteria włączenia do badań**:

1. wyrażona pisemna zgoda rodziców/opiekunów na uczestnictwo dziecka w badaniach
2. wiek dziecka: 7-15 lat
3. rozpoznany rodzaj i stopień ciężkości astmy oskrzelowej wg zaleceń GINA 2002
4. stwierdzona nadwrażliwość na alergen roztoczy kurzu domowego
  - dodatnie wyniki testów skórnych z alergenami roztoczy *D.pter.*, *D.farinae* (testy skórne *Soluprick ALK* - średnica bąbla alergenowego > 3 mm)
  - IgE swoiste roztocza >II klasa
  - podwyższone stężenie całkowitego IgE w surowicy >120 IU/ ml (poziom IgE oznaczany metodą CAP-RIA system firmy Pharmacia, przyjmuje się, że poziom przeciwciał > 120 IU/ml koreluje w 78% z występowaniem objawów atopii)
5. **zaostrzenia przebiegu** choroby  $\geq 1$  w ciągu ostatniego roku, które definiowano jako wystąpienie co najmniej jednego z poniższych danych:
  - **w wywiadzie**: wystąpienie co najmniej jednego objawu astmatycznego trwającego co najmniej 24 godziny pod postacią: duszności, świszczącego oddechu (wheezing), ucisku w klatce piersiowej, suchego napadowego kaszlu (dziennego i/lub nocnego),
  - **w badaniach czynnościowych układu oddechowego**: obniżenie wartości **FEV1** co najmniej o 15% wartości maksymalnej lub obniżeniem obserwowanego **PEF** co najmniej o 20% wartości maksymalnej lub wzrost **zmienności dobowej PEF** powyżej 20%,
  - **wzrostem** zużycia  $\beta$ 2-mimetyku krótkodziałającego  $\geq 3$ -4dawk na dobę
6. otrzymujące wziewne glikokortykosteroidy (GKS<sub>w</sub>)

Pacjenci z astmą, których rodzice wyrazili pisemną zgodę na udział dziecka w badaniu zostali włączeni do jednej z dwóch grup badanych:

**I grupa (ZAO)** – dzieci ze stwierdzonymi w chwili włączenia do badania objawami zaostrzenia astmy

**II grupa (PAO)** – dzieci bez objawów zaostrzenia astmy w chwili włączenia do badania.

Po zakwalifikowaniu dziecka do danej grupy wykonano następujące procedury i badania:

**1. Przeprowadzenie wywiadu z określeniem:**

- wieku, w którym rozpoznano astmę u dziecka
- liczby zaostrzeń choroby w ciągu ostatnich 12-tu miesięcy
- aktualnej dawki leków p/zapalnych (wziewnych lub doustnych GKS)
- częstości stosowania  $\beta_2$  – mimetyku szybko i krótko działającego,
- wstępnej klinicznej punktacji objawów (z ostatniego tygodnia poprzedzającego wizytę)
- współistnienia i leczenia innych chorób alergicznych (atopowe zapalenie skóry, alergiczny nieżyt błony śluzowej nosa)
- wykluczenie infestacji pasożytniczej (ujemny wynik badania stolca na pasożyty i antygen *G. lamblia*)
- wywiadu rodzinnego odnośnie chorób alergicznych

**2. Badania czynnościowe układu oddechowego (spirometria)**

**3. Pobranie materiału do badań serologicznych** wg przygotowanego schematu (vide metoda badawcza).

**4. Szczegółowe wyjaśnienie pacjentowi/opiekunom:**

- zasad określenia zaostrzenia astmy za pomocą poniższej **punktowej skali objawów:**

**Objawy dzienne:**

- 0** – brak objawów.
- 1** – objawy 1 raz dziennie.
- 2** – objawy dwa lub więcej razy dziennie.
- 3** – objawy występują przez większość dnia i ograniczają normalną aktywność dziecka.
- 4** – objawy tak ciężkie, że dziecko nie może iść do szkoły lub wykonywać normalnej aktywności

**Objawy nocne:**

- 0** – brak objawów.
- 1** – objawy budzą dziecko 1 raz w ciągu nocy ( przedwczesne budzenie się)
- 2** – objawy budzą dziecko 2 lub więcej razy w ciągu nocy
- 3** – objawy powodują, że dziecko nie śpi przez większość nocy
- 4** - dziecko nie może spać

- metod obliczania **zmienności dobowej PEF** - za wzór do obliczania wskaźnika dobowej zmienności PEF przyjęto:

$$\Delta\text{PEF} = (\text{PEF max} - \text{PEF min}) \times 100\% : (\text{PEFmax} + \text{PEFmin}) \times 0,5$$

- wzrostu zużycia  $\beta_2$ -mimetyków krótkodziałających

**5. Zlecenie codziennego monitorowania PEF i skali punktowej objawów astmy z odnotowaniem wyników w **dzienniczku obserwacji** (tab.23 aneksu) do czasu kolejnej wizyty kontrolnej.**

Następnie dzieci z obu grup badanych miały założone indywidualne karty obserwacji pacjenta (tab. 24 i 25 aneksu ) i były poddane 24 tygodniowej obserwacji z zaleceniem zgłaszania się do Poradni Pulmonologicznej i Alergologicznej w trakcie każdego kolejnego zaostrzenia choroby.

W trakcie wizyt kontrolnych (przy kolejnych zaostrzeniach przebiegu astmy) wykonywano:

1. Weryfikację wystąpienia zaostrzenia choroby na podstawie:
  - **oceny punktacji klinicznych objawów astmy z 7 dni poprzedzających wizytę**
  - **oceny policzonej wartości zmienności dobowej PEF,**
  - **badania czynnościowych układu oddechowego (FEV1, PEF, MEF 25-75, FVC)**
2. Modyfikowano dotychczasowe leczenie p/zapalne o stopień wyżej z podwyższeniem dawki wziewnych GKS lub w razie konieczności zastosowanie doustnych GKS.
3. Zlecano codzienne monitorowanie PEF, punktowej skali objawów astmy i zużycia  $\beta_2$ -mimetyku krótko działającego oraz kontrolę leczenia za 3 dni.
4. Pobierano krew do badań serologicznych wg zaplanowanego schematu (vide rozdz.4.3).

## II. Grupa kontrolna

Badaniem objęto 50 pacjentów (24 dziewczynki i 26 chłopców) zgłaszających się do Poradni Ortopedycznej USD w okresie od 01.10.2002 do 01.05.2003 (z uwzględnieniem rozkładu wieku i płci dzieci z grupy badanej) i spełniających wszystkie kryteria włączenia do badania:

1. wyrażona pisemna zgoda rodziców/opiekunów na uczestnictwo dziecka w badaniu
2. wiek dziecka: 7-15 lat
3. ujemny wywiad w kierunku atopii i innych chorób atopowych
4. ujemny wynik testów skórnych typu Prick z sześcioma wybranymi aeroalergenami,
5. poziom IgE całkowitego w normie
6. wykluczona infestacja pasożytnicza (ujemny wynik badania stolca na pasożyty i antygen *G. lamblia*)
7. prawidłowe wyniki badań czynnościowych płuc

Po zakwalifikowaniu do grupy kontrolnej dziecko miało założoną kartę obserwacji (tab.26 aneksu), wykonywane podstawowe badania laboratoryjne (morfologia, OB) oraz pobieraną krew do badań serologicznych wg zaplanowanego schematu (vide rozdz.4.3).

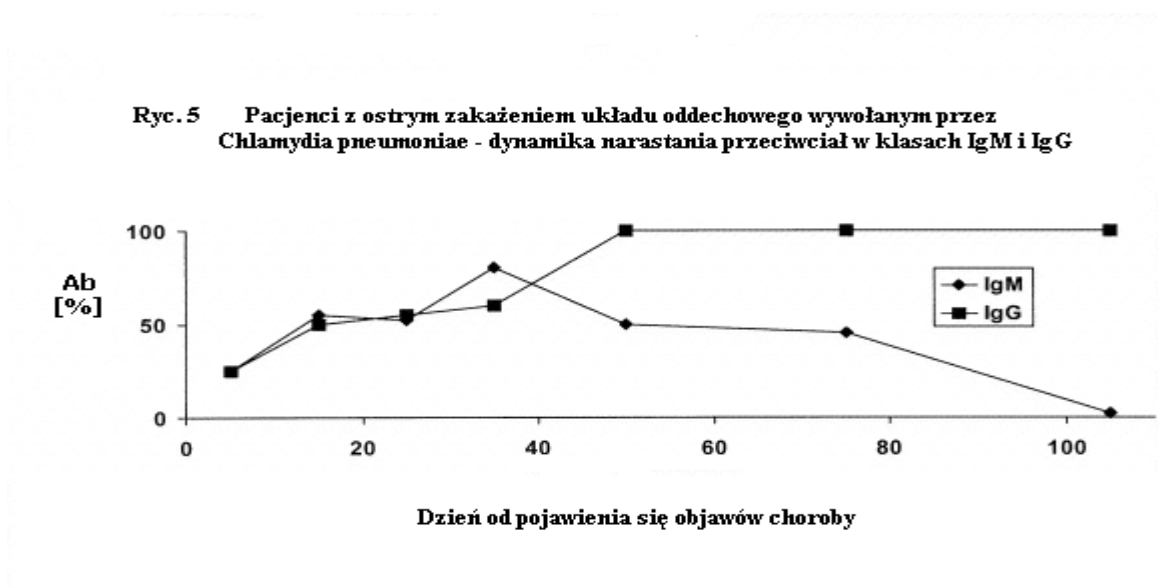


## 4.2 Materiał

Materiał do badań serologicznych stanowiło 6 ml krwi, która była pobierana do jałowych probówek polistyrenowych okrągłodennych o pojemności 4 ml (Equimed, Polska), następnie w sterylnych warunkach wykrzepiana i odwirowywana w celu uzyskania surowicy. Uzyskana surowica była kolekcjonowana w parzystych, jałowych probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml (Equimed, Polska) i początkowo ochładzana do temperatury (+4<sup>0</sup>C) a następnie zamrażana do temp (-20<sup>0</sup>C) do czasu wykonania oznaczeń metodą mikroimmunofluorescencyjną (MIF) w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

## 4.3 Pobieranie materiału do badań serologicznych.

W diagnostyce zakażeń *Ch. pneumoniae* przyjęto zasadę badania dynamiki narastania miana przeciwciał w dwóch kolejnych próbkach surowic. Czterokrotne zwiększenie miana przeciwciał uznajemy za wynik diagnostycznie znamienne, choć wzrost może być niewykrywalny lub stężenie przeciwciał narasta przez wiele miesięcy.



**Interpretacja mian przeciwciał przeciw *Ch. pneumoniae* przyjęta przez producenta testu MIF (firma Ani Labsystem-Finlandia):**

	cut off 1:16	cut off 1:32	cut off 1:8
brak zakażenia	IgM=0,	IgG=0,	IgA=0,
przebyte zakażenie/kontakt z patogenem	IgM=0,	IgG 1:32,	IgA=0,
infekcję ostrą	IgM 1:16 lub	IgG 1:512 lub	IgA 1:64
infekcję przewlekłą	IgM=0	IgG 1:32 1:512	IgA 1:8 i 1:64

W pierwotnym ostrym zakażeniu *Ch. pneumoniae* odpowiedź w klasie IgM przeciwciał może być wykrywana już w pierwszej próbce surowicy. Odpowiedź w klasach IgG i IgA rozwija się znacznie wolniej, zwłaszcza jeżeli pacjent otrzymywał antybiotyki przeciw zakażeniu *Ch. pneumoniae*. Stałe lub obniżające się końcowe miana IgG i / lub IgA z ujemnymi IgM świadczą o zakażeniu przewlekłym.

W grupach badanych i kontrolnej krew do badań serologicznych była pobierana w trakcie rutynowych badań, w odstępach czasu pozwalających na śledzenie dynamiki narastania przeciwciał przeciw *Ch. pneumoniae* w klasach IgM, IgG i IgA, a tym samym określenie rodzaju zakażenia (ostre, przewlekłe, przebyte w przeszłości) występującego u dziecka.

W grupie I (ZAO) krew do badań serologicznych była pobierana u dzieci po 3 (I badanie serologiczne) i 6 (II badanie serologiczne) tygodniach od pierwszych objawów zaostrzenia astmy oskrzelowej oraz w dniu zakończenia 24 tygodniowej obserwacji (III badanie serologiczne).

W grupie II (PAO) pierwsze badanie serologiczne wykonywane było w dniu włączenia dziecka do badania, celem określenia wstępnego statusu serologicznego u dziecka w odniesieniu do zakażenia *Ch. pneumoniae*. Kolejne badania serologiczne w tej grupie dzieci były uzależnione od wystąpienia lub braku objawów zaostrzenia astmy oskrzelowej. U pacjentów, u których w trakcie obserwacji wystąpiło zaostrzenie objawów choroby, krew do badań serologicznych była pobierana podobnie jak w grupie I to znaczy w 3 (II badanie serologiczne) i 6 (III badanie serologiczne) tygodniu od pierwszych objawów zaostrzenia astmy oskrzelowej oraz po zakończeniu 24 tygodniowej obserwacji (IV badanie serologiczne). Natomiast dzieci bez objawów zaostrzenia astmy oskrzelowej w trakcie 24 tygodniowej obserwacji miały wykonywane drugie badanie serologiczne w dniu zakończenia badania.

W grupie kontrolnej krew do badań serologicznych była pobierana u dzieci w dniu włączenia do badań (I badanie serologiczne) i po 24 tygodniach od włączenia do badania (II badanie serologiczne)

Opisany schemat pobierania krwi do badań przedstawia rycina 6.

Ryc. 6 Schemat pobierania materiału do badań serologicznych.

Grupa I (n=39)	Grupa II (n=31)	Grupa kontrolna (n=50)	
<b>I badanie serologiczne</b> - 3 tygodnie od pierwszych objawów zaostrzenia astmy	<b>I badanie serologiczne</b> - w dniu włączenia do badania  <b>Zaostrzenie astmy</b> oskrzelowej w trakcie obserwacji  <b>Brak zaostrzenia astmy</b> oskrzelowej w trakcie obserwacji	<b>I badanie serologiczne</b> - w dniu włączenia do badania	
<b>II badanie serologiczne</b> - 6 tygodni od pierwszych objawów zaostrzenia astmy	<b>II badanie serologiczne</b> - 3 tygodnie od pierwszych objawów zaostrzenia astmy	<b>II badanie serologiczne</b> - po 24 tygodniach obserwacji	<b>II badanie serologiczne</b> - po 24 tygodniach
<b>III badanie serologiczne</b> - po 24 tygodniach obserwacji	<b>III badanie serologiczne</b> - 6 tygodni od pierwszych objawów zaostrzenia astmy		
	<b>IV badanie serologiczne</b> - po 26 tygodniach obserwacji		

Na przeprowadzenie powyższych badań uzyskano zgodę Komisji Biotycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (opinia nr KBET/113/B/2000).

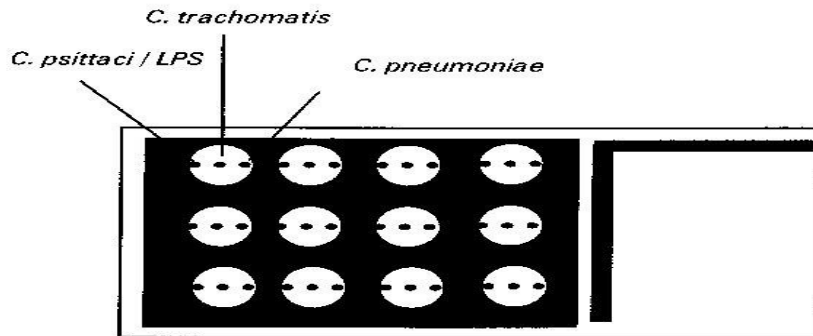
#### 4.4. Oznaczenie poziomu przeciwciał dla *Ch. pneumoniae* w surowicy krwi metodą mikroimmunofluorescencji.

Poziom przeciwciał klasy IgM, IgA i IgG dla 3 gatunków *Chlamydia* oznaczano metodą mikroimmunofluorescencji wykorzystując zestawy firmy ANI Labsystem, Finlandia (vide zasada badania). W stosowanych testach, w każdym dołku jako antygen diagnostyczny nałożone były obok siebie oczyszczone ciała elementarne *Ch. pneumoniae*, *Ch. trachomatis* i *Ch. psittaci/LPS*. Na szkiełka z antygenami nakładano seryjne rozcieńczenia badanej surowicy w roztworze fizjologicznym chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) zaczynając od 1:8. W przypadku oznaczania przeciwciał klasy IgM i IgA wykonywano najpierw wstępną immunoprecypitację w celu wytrącenia wolnych lub związanych w kompleksach przeciwciał klasy IgG. W tym celu sporządzano rozcieńczenia badanych surowic z roztworem do immunoprecypitacji (Labsystem's IgG blocking reagent) w stosunku 1:8 inkubowano je w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a następnie wirowano. Dalsze dwukrotne seryjne rozcieńczenia surowicy wykonywano już podobnie jak przy oznaczaniu przeciwciał klasy IgG w PBS. Tak przygotowane próbki nakładano na szkiełka z antygenami *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci/LPS*, *Ch. trachomatis* i inkubowano w wilgotnej komorze w temperaturze 37°C przez 30 min. Następnie przemywano preparaty w PBS i suszono w temp 37°C. W następnej kolejności dodawano do każdego dołka po kropli konjugatu surowicy koziej (przy oznaczaniu przeciwciał klasy IgG i IgA) lub króliczej (przy oznaczaniu przeciwciał klasy IgM), sprzężonego z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC). Szkiełka inkubowano w wilgotnej komorze w temp 37°C przez 30 min, przemywano w roztworze PBS i osuszano całkowicie. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym (Nikon HB-10101 AF, Japonia), przy powiększeniu 10x40. Do każdej serii oznaczeń dołączano kontrolę dodatnią (surowica zawierająca przeciwciała dla *Ch. pneumoniae*) i kontrolę ujemną (surowica nie wykazująca reakcji z antygenami *Ch. pneumoniae*). W oznaczeniach poziomu przeciwciał klasy IgM, obecność przeciwciał o mianie 1:16 przyjmowano jako wynik dodatni. W oznaczeniach poziomu przeciwciał klasy IgG jako dodatnie przyjmowano miano 1:32, natomiast za dodatnie przyjmowano miano w klasie przeciwciał IgA 1:8.

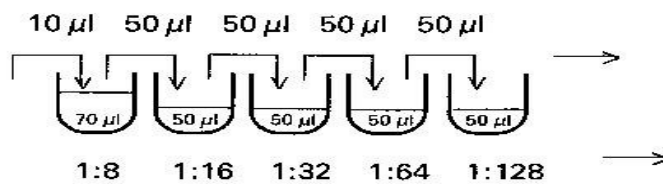
## Zasada badania metodą mikroimmunofluorescencyjną MIF

(*Ch.pneumoniae* Micro-IF Test ANI –Labsystems, Finlandia)

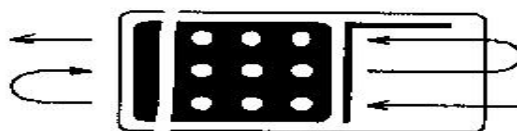
1. Antygen EB dla *Ch.pneumoniae* był utrwalony na szkiełku podstawowym w 21 dołkach wraz z antygenami EB dla *Ch.psittaci/LPS* i *Ch.trachomatis* jako kontrolami dodatnimi



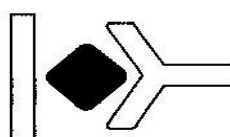
2. Nanoszenie na szkiełka podstawowe 10  $\mu$ l seryjnych rozcieńczeń badanej surowicy w roztworze fizjologicznym chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS)



i 1 kropli nierozcieńczonych surowic kontrolnych: dodatniej – zawierającej przeciwciała dla *Ch. pneumoniae* i ujemnej – nie wykazującej reakcji z antygenami *Ch. pneumoniae* w następującej kolejności

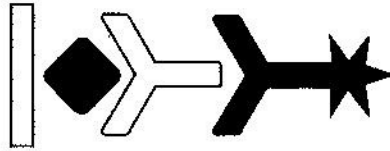


3. Inkubacja w wilgotnej komorze w temperaturze 37°C przez 30 minut
4. Przemycanie i osuszanie szkiełek



Antygen *Ch. pneumoniae* opłaszczony przeciwciałem (klasy IgM, IgG lub IgA) z surowicy pacjenta

5. Dodanie do dołków konjugatu surowicy zwierzęcej zawierającej swoiste przeciwciała znakowane izotiocyjaninem fluoresceiny FITC przeciw ludzkim przeciwciałom antychlamydyalnym klasy IgA, IgM lub IgG
6. Inkubacja w wilgotnej komorze w temperaturze 37<sup>0</sup>C przez 30 minut
7. Przemycanie i osuszanie szkiełek

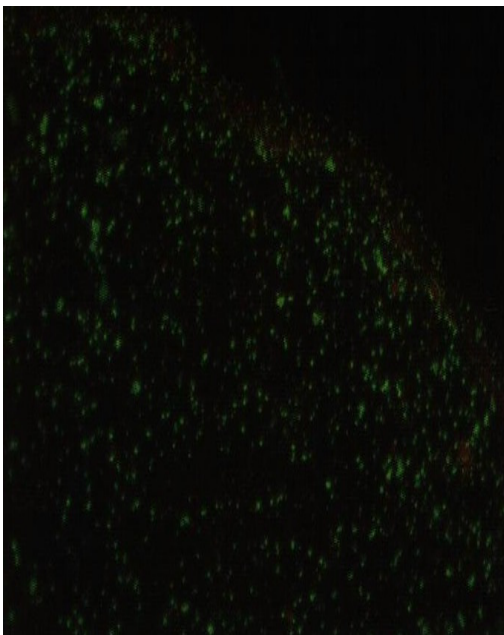


**Przeciwciała znakowane izotiocyjaninem fluoresceiny przyłączone do ludzkiego przeciwciała (klasy IgA, IgM lub IgG) opłaszczającego antygen *Ch.pneumoniae***

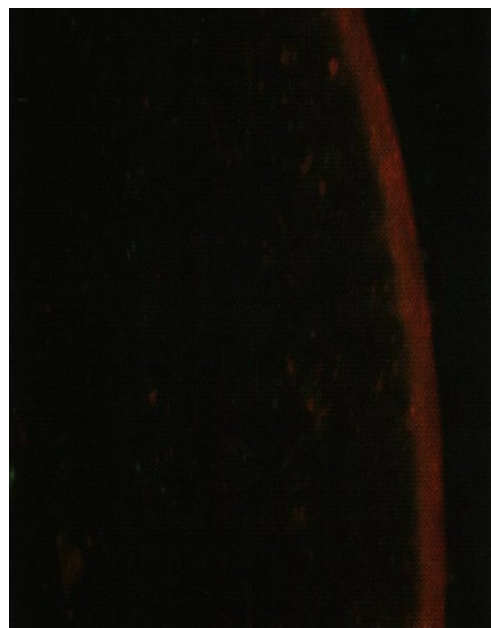
8. Dodanie płynu utrwalającego (glicerol z dodatkiem 15 ml azydku sodu jako konserwanta)
9. Oglądanie szkiełek przy użyciu mikroskopu immunofluorescencyjnego (Nikon HB-10101AF, Japan) w powiększeniu 10x40.

Tam, gdzie doszło do swoistej reakcji między antygenem a przeciwciałem, przyłączona znakowana antyludzka immunoglobulina powodowała jasnozieloną fluorescencję antygeny.

**wynik dodatni**



**wynik ujemny**



#### 4.5 Analiza statystyczna

Porównania zmiennych jakościowych (płeć itp.) dokonano przy użyciu testu Fishera (dwustronnego) lub w przypadku porównania więcej niż 2 grup testu  $\chi^2$  Pearsona.

W przypadku zmiennych ilościowych w pierwszym etapie oceny dokonano sprawdzenia charakteru rozkładu. Normalność rozkładu testowano testem Lillieforsa, przyjmując założenie, że średnia i odchylenie standardowe zmiennych nie są znane i są dopiero obliczane z danych. Hipotezę o normalności rozkładu odrzucano, gdy wartość statystyki D była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ). Ze względu na fakt, że rozkład większości zmiennych był różny od rozkładu normalnego do porównania badanych grup stosowano test U Manna-Whitney'a lub analizę wariancji Kruskalla-Wallisa (Kruskall-Wallis ANOVA).

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu komputerowych programów statystycznych: Statistica 6.0 PL (StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA for Windows) oraz StatsDirect for Windows (2001).

Różnice i zależności uznano za istotne statystycznie, jeżeli prawdopodobieństwo odrzucenia prawdziwej hipotezy zerowej wynosiło mniej niż 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. Wyniki

### 5.1 Wyniki badania

Badaniem objęto 120 dzieci w wieku od 7 do 15 lat ( $x \pm \text{SEM}$ : 11,3 $\pm$ 0,2 lat), w tym 50 dziewcząt i 70 chłopców. Odpowiednio do grup zakwalifikowano:

- **I grupa (ZAO)** dzieci z zaostrzeniem objawów astmy oskrzelowej w dniu kwalifikacji do badania – 39 dzieci (15 dziewczynek i 24 chłopców)
- **II grupa (PAO)** dzieci bez objawów zaostrzenia astmy oskrzelowej w dniu kwalifikacji do badania – 31 dzieci (11 dziewczynek i 20 chłopców)
- **grupa kontrolna** – 50 dzieci (24 dziewczynki i 26 chłopców)

Porównanie wybranych cech demograficznych w badanych grupach przedstawia tabela 4.

Badane grupy nie różniły się istotnie pod względem wieku i płci.

**Tabela 4. Porównanie wybranych cech demograficznych w badanych grupach**

Grupa	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO	Kontrola	p
Wiek (lat) (Me, 25-75 percentyl)	11 (9-12)	12 (11-13)	12 (10-13)	0,09 <sup>1</sup>
Płeć (żeńską/męską)	15/24	11/20	24/26	0,47 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> – p dla ANOVA rang Kruskala-Wallis

<sup>2</sup> – p dla testu  $\chi^2$  Pearsona

Porównanie wybranych cech klinicznych w grupach chorych z astmą oskrzelową przedstawia tabela 5.

**Tabela 5. Porównanie wybranych cech klinicznych w grupach chorych z astmą oskrzelową**

Grupa	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO	p
Czas od momentu rozpoznania (lat) (Me; 25-75 percentyl)	5 (4-8)	4 (3-5)	0,001 <sup>1</sup>
Liczba zaostrzeń AO w ciągu ostatnich 12 mies. (Me; 25-75 percentyl)	4 (3-6)	4 (2-6)	0,28 <sup>1</sup>
Liczba hospitalizacji z powodu AO w ciągu ostatnich 12 mies. (Me; 25-75 percentyl)	1 (0-1)	0 (0-0)	0,08 <sup>1</sup>
Atopowy nieżyt nosa (n/%)	35 (89%)	28 (90%)	0,46 <sup>2</sup>
Atopowe zapalenie skóry (n/%)	14 (36%)	10 (32%)	0,75 <sup>2</sup>
Dodatni wywiad rodzinny (n/%)	30 (77%)	24 (77%)	0,98 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> – p dla testu U Manna-Whitney'a

<sup>2</sup> – p dla testu  $\chi^2$  Pearsona



Zakwalifikowani do badania pacjenci z grupy ZAO (z zaostrzeniem objawów astmy oskrzelowej) różnili się od pacjentów z grupy PAO (bez objawów zaostrzenia astmy) jedynie czasem, jaki upłynął od momentu rozpoznania choroby, który w grupie ZAO był istotnie statystycznie dłuższy ( $p=0,001$ ).

Poza tym dzieci z obu grup badanych ZAO i PAO nie różniły się pod względem liczby zaostrzeń astmy oskrzelowej, obserwowanych w ciągu 12 miesięcy poprzedzających kwalifikację do badania oraz liczby hospitalizacji z powodu ciężkich zaostrzeń choroby. U dzieci z obu grup badanych stwierdziłam dodatkowo objawy innych niż astma chorób atopowych, w tym alergicznego nieżytu nosa (ZAO/PAO: 89% vs 90%), atopowego zapalenia skóry (36% vs 32%) oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku występowania chorób alergicznych (77 vs 77%).

Porównanie nasilenia objawów choroby w okresie 7 dni przed rozpoczęciem badania przedstawiłam w tabeli 6. U pacjentów z grupy ZAO stwierdziłam znamienne większe nasilenie objawów astmatycznych zarówno dziennych jak i nocnych (głównie suchego, napadowego kaszlu), oceniane średnio na 2 punkty w 4 stopniowej skali nasilenia objawów choroby, znamienne wyższe zużycie  $\beta_2$ -mimetyków oraz istotny statystycznie wzrost zmienności dobowej PEF i znamienne przyrost wartości  $FEV_1$  w teście bronchodilatacyjnym wykonywanym w dniu kwalifikacji dziecka do badania ( $p<0,001$ ).

**Tabela 6. Nasilenie objawów astmy oskrzelowej w okresie 7 dni przed rozpoczęciem badania**

<b>Grupa</b>	<b>Zaostrzenie AO</b>	<b>Przewlekła AO</b>	<b>P</b>
Nasilenie objawów AO w ciągu dnia w skali punktowej od 0 do 4 pkt. (Me; 25-75 percentyl)	2 (2-4)	0 (0-1)	<0,001 <sup>1</sup>
Nasilenie objawów AO w ciągu nocy w skali punktowej od 0 do 4 pkt. (Me; 25-75 percentyl)	2 (1-4)	0 (0-0)	<0,001 <sup>1</sup>
Dobowa liczba dawek $\beta_2$ -mimetyków (Me; 25-75 percentyl)	4 (0-4)	0 (0-0)	<0,001 <sup>1</sup>
Zmienność $FEV_1$ (%) w dniu kwalifikacji do badania (Me; 25-75 percentyl)	15 (13-21)	5 (3-8)	<0,001 <sup>1</sup>
Zmienność dobową PEF ( $\Delta$ PEF) (Me; 25-75 percentyl)	23 (21-26)	6 (4-9)	<0,001 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> – p dla testu U Manna-Whitney'a

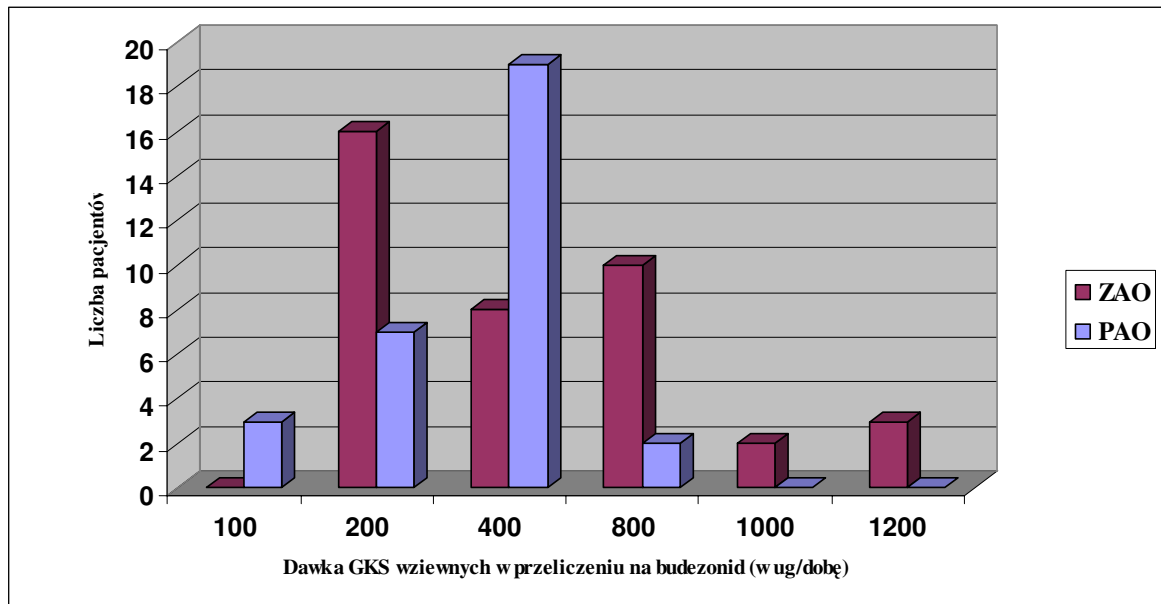
Obie grupy pacjentów (ZAO i PAO) różniły się również istotnie pod względem przyjmowanej dawki wziewnych glikokortykosteroidów, w przeliczeniu na budezonid ( $p=0,001$ ), co przedstawiłam w tabeli 7 i graficznie na rycinie 7.

**Tabela 7. Dawki przyjmowanych glikokortykosteroidów wziewnych w grupie dzieci z zaostrzeniem objawów astmy i w grupie przewlekłej astmy oskrzelowej**

Dawka GKS w przeliczeniu na budesonidu (ug/dobę)	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO
100	0	3 (10%)
200	16 (41%)	7 (23%)
400	8 (20%)	19 (61%)
800	10 (26%)	2 (6%)
1000	2 (5%)	0
1200	3 (8%)	0

p= 0,001 (test  $\chi^2$  Pearsona)

**Ryc. 7 Dawki wziewnych glikokortykosteroidów w poszczególnych grupach badanych**



Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych wykonywanych w dniu włączenia pacjentów do badania we wszystkich grupach przedstawiają tabela 8 oraz ryciny 8 i 9.

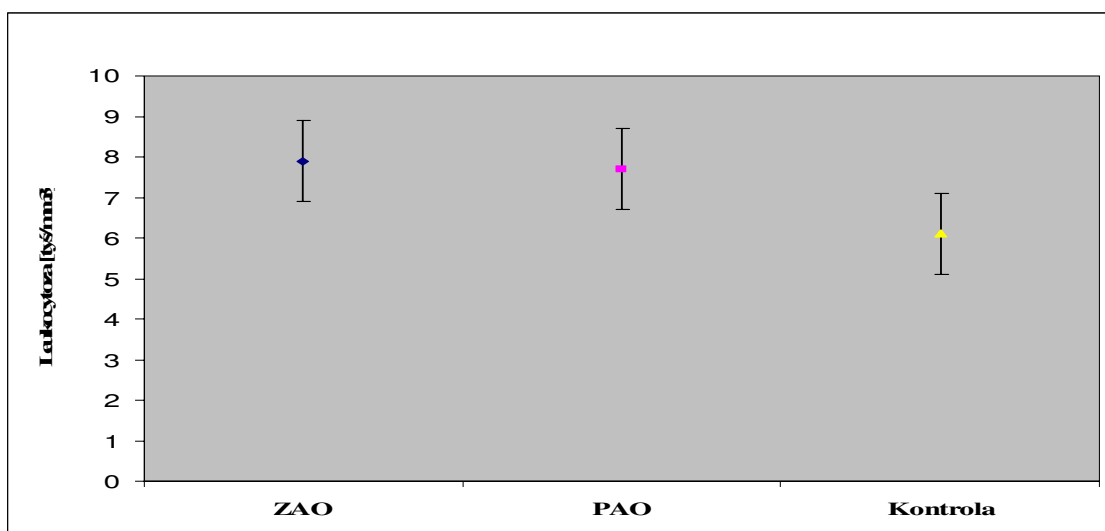
Na podstawie przeanalizowanych wyników stwierdziłam, że w grupie badanej leukocytoza mieściła się w granicach normy, ale była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Podobnie eozynofilia krwi obwodowej (oceniana na podstawie bezwzględnej liczby eozynofili na  $\text{mm}^3$  krwi) była znamienne wyższa w grupie badanej niż kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Po wykluczeniu infestacji pasożytniczej u badanych dzieci powyższe wyniki mogłyby już wstępnie sugerować atypową etiologię zakażenia, z uwagi na silnie modulujący wpływ zakażenia *Ch. pneumoniae* na przebieg obserwowanego w astmie oskrzelowej zapalenia eozynofilowego.

**Tabela 8.** Średnie wartości leukocytozy i bezwzględnej liczby eozynofili w grupach badanych i kontrolnej

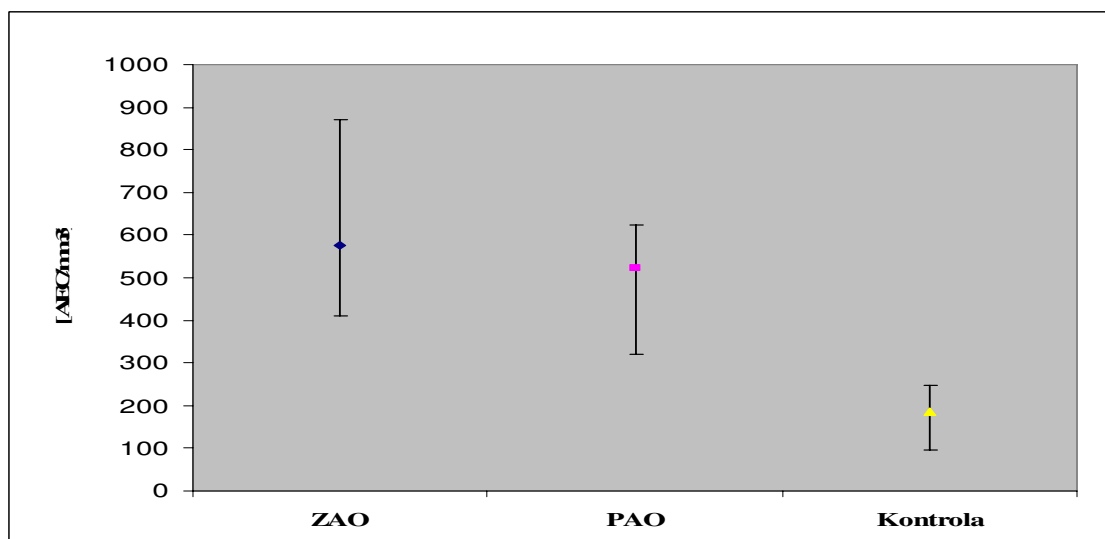
Grupa	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO	Kontrola	p
Leukocytoza (tys./mm <sup>3</sup> ) (Me; 25-75 percentyl)	7,9 (6,5-9,2)	7,7 (6,2-9,5)	6,1 (4,7-7,5)	<0,001 <sup>1</sup>
Bezwzględna liczba eozynofili (AEC/mm <sup>3</sup> ) (Me; 25-75 percentyl)	576 (410-870)	522 (320-624)	184 (96-246)	<0,001 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> – p dla ANOVA rang Kruskala-Wallisa,

**Ryc. 8** Wartości leukocytozy w poszczególnych grupach badanych w dniu kwalifikacji do badania (dane przedstawione jako mediana oraz 25-75 percentyl)



**Ryc. 9** Wartości bezwzględne eozynofili (AEC) w poszczególnych grupach badanych w dniu kwalifikacji do badania (dane przedstawione jako mediana oraz 25-75 percentyl)



W celu zmniejszenia liczby czynników zaburzających obserwację i mogących mieć wpływ na przebieg astmy oskrzelowej u dzieci włączonych do grup badanych (zwłaszcza zmienne stężenie aeroalergenów), do ustalenia zakładanej w badaniu korelacji pomiędzy zakażeniem *Ch. pneumoniae* a występowaniem kolejnych zaostrzeń astmy oskrzelowej, dalszej analizie poddano pacjentów, którzy wykazywali głównie uczulenie na alergeny roztoczy kurzu domowego.

W obu grupach badanych pacjenci mieli wykonane oznaczenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE przeciwko roztoczom kurzu domowego (uzyskane wyniki przedstawia tabela 9) oraz oznaczenia całkowitego stężenia IgE (wyniki przedstawia tabela 10).

**Tabela 9. Wyniki oznaczenia klasy swoistych przeciwciał IgE przeciwko roztoczom kurzu domowego w grupach chorych z astmą**

Klasa swoistego IgE przeciwko roztoczom kurzu domowego	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO
2	0	2 (6%)
3	9 (23%)	10 (32%)
4	19 (49%)	11 (35%)
5	4 (10%)	4 (13%)
6	7 (18%)	4 (13%)

p= 0,39 (test  $\chi^2$  Pearsona)

**Tabela 10. Wyniki oznaczenia całkowitego stężenia IgE przeciwko roztoczom kurzu domowego w grupach chorych z astmą**

Stężenie IgE całkowite (IU/ml)	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO
<120	4 (10%)	2 (6%)
120-500	15 (39%)	16 (52%)
>500	20 (51%)	13 (42%)

p= 0,53 (test  $\chi^2$  Pearsona)

W czasie 24 tygodniowej obserwacji wśród 70 dzieci z astmą oskrzelową (26 dziewczynek i 44 chłopców) zaobserwowałam 253 epizody zaostrzenia choroby. Liczba dzieci z astmą, u których stwierdziłam conajmniej jeden epizod zaostrzenia objawów choroby w trakcie 24 tygodniowej obserwacji była istotnie większa w grupie I czyli dzieci z zaostrzeniem objawów astmy w dniu kwalifikacji do badania (ZAO) niż w grupie dzieci bez objawów zaostrzenia astmy w dniu kwalifikacji do badania (PAO) (ZAO/PAO: 97% vs 68%; p = 0,01). Podobnie liczba epizodów zaostrzenia choroby, w tym również wymagających podania glikokortykosteroidów doustnych lub hospitalizacji dziecka była statystycznie większa w grupie dzieci z zaostrzeniem AO, wyniki przedstawiłam w tabeli 11.

**Tabela 11. Charakterystyka zaostżeń astmy w trakcie 24 tygodniowej obserwacji wśród dzieci z grupy badanej**

Grupa	Zaostrzenie AO	Przewlekła AO	P
Liczba dzieci, u których stwierdzono conajmniej 1 epizod zaostżenia (n/%)	38 (97%)	21 (68%)	0,01 <sup>1</sup>
Liczba zaostżeń (Me, 25-75 percentyl)	4 (3-6)	2 (0-3)	<0,001 <sup>2</sup>
Liczba dzieci, u których istniała konieczność podania GKS doustnie (n/%)	12 (31%)	2 (6,5%)	0,03 <sup>1</sup>
Liczba doustnych kursów GKS (Me)	1	0	0,07 <sup>2</sup>
Liczba dzieci hospitalizowanych z powodu zaostżenia AO (n/%)	8 (21%)	2 (6,5%)	0,2 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> – p dla testu dwustronnego Fishera

<sup>2</sup> – p dla testu U Manna-Whitney

Występowanie ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* (określonego serologicznie) przyjęto za czynnik ryzyka występowania kolejnych zaostżeń astmy u chorych dzieci w trakcie 24 tygodniowej obserwacji.

Analizę uzyskanych wyników badań serologicznych w kierunku zakażenia *Chlamydia pneumoniae* rozpocznę od grupy dzieci z przewlekłą AO w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej. W obu grupach nie obserwowałam klinicznych objawów sugerujących zakażenie *Ch. pneumoniae* w dniu kwalifikacji dzieci do badania, natomiast w uzyskanych wynikach badań serologicznych stwierdziłam, że w grupie PAO mniejsza liczba dzieci prezentowała cechy ostrego zakażenia tym patogenem w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej (PAO/K: 26% vs 40%), natomiast częstość zakażenia przewlekłego była podobna w obu grupach (PAO/K: 19% vs 10%) w chwili kwalifikacji do badania, co przedstawia tabela 12.

**Tabela 12 Wyniki badań serologicznych w kierunku zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w chwili kwalifikacji do badania w grupie dzieci z przewlekłą AO (PAO) i w grupie kontrolnej**

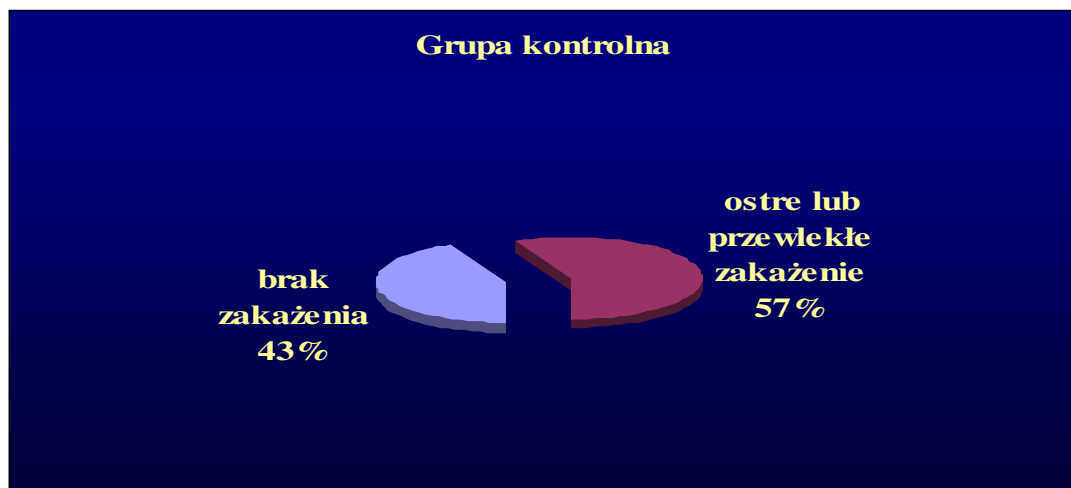
	Przewlekła AO (n=31)	Kontrola (n=50)
Brak infekcji	8 (26%)	19 (38%)
Przebyte zakażenie w przeszłości	9 (29%)	6 (12%)
Ostre zakażenie	8 (26%)	20 (40%)
Przewlekłe zakażenie	6 (19%)	5 (10%)

Wyłączając z analizy dzieci, które w dniu kwalifikacji do badania prezentowały serologiczne cechy przebytego zakażenia w przeszłości, można zaobserwować, że wśród pacjentów z przewlekłą AO i w grupie kontrolnej podobna ilość dzieci prezentowała cechy ostrego i przewlekłego zakażenia (PAO/K: 64% vs 57%) co przedstawia tabela 13 i rycina 10 .

**Tabela 13** Liczba dzieci prezentujących serologiczne cechy ostrego lub przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie pacjentów z przewlekłą astmą (PAO) w porównaniu do grupy kontrolnej

	Przewlekła AO (n=22)	Kontrola (n=44)
Brak infekcji	8 (36%)	19 (43%)
Ostre lub przewlekłe zakażenie	14 (64%)	25 (57%)

**Ryc. 10** Odsetek dzieci prezentujących serologiczne cechy ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie pacjentów z przewlekłą astmą (PAO) w porównaniu do grupy kontrolnej

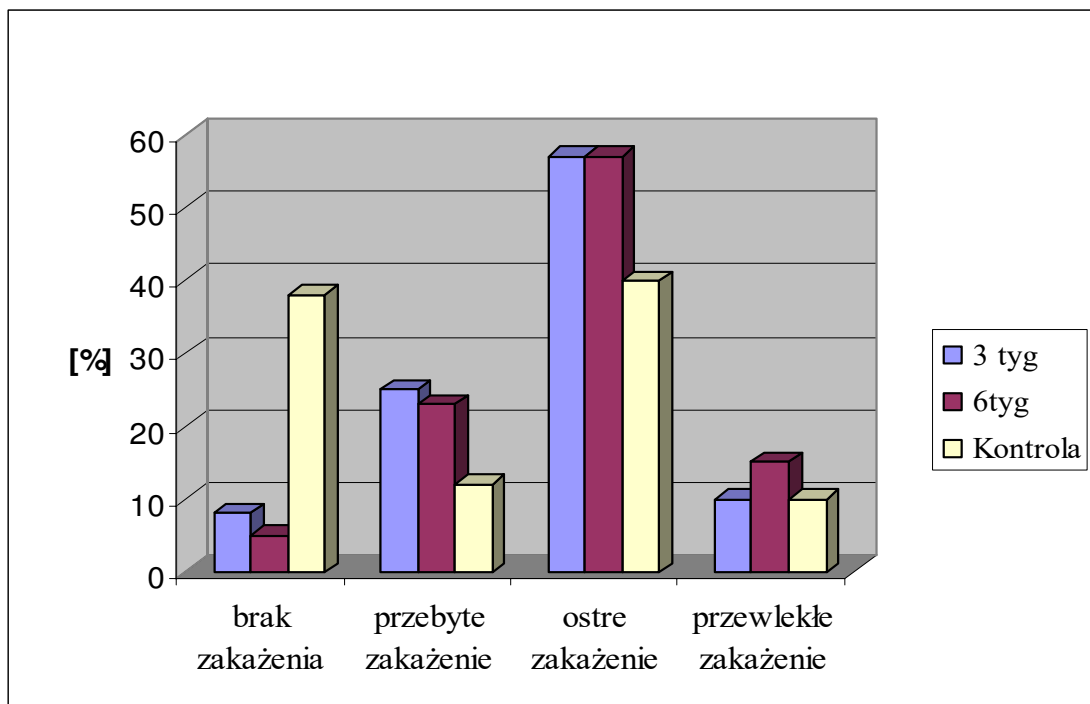


Wyniki badań serologicznych po 3 i 6 tygodniach od kwalifikacji do badania w grupie dzieci z zaostrzeniem AO (ZAO) w porównaniu do grupy kontrolnej przedstawia tabela 14 i graficznie rycina 11.

**Tabela 14** Wyniki badań serologicznych po 3 i 6 tygodniach od kwalifikacji do badania w grupie dzieci zakwalifikowanych do grupy zaostrzenie AO w porównaniu do grupy kontrolnej

	3 tygodnie od zaostrzenia objawów AO	6 tygodni od zaostrzenia objawów AO	kontrola
Brak infekcji	3 (8%)	2 (5%)	19 (38%)
Przebyte zakażenie w przeszłości	10 (25%)	9 (23%)	6 (12%)
Ostre zakażenie	22 (57%)	22 (57%)	20 (40%)
Przewlekłe zakażenie	4 (10%)	6 (15%)	5 (10%)

**Ryc. 11** Wyniki badań serologicznych po 3 i 6 tygodniach od kwalifikacji do badania w grupie dzieci z zaostrzeniem astmy ZAO w porównaniu do grupy kontrolnej



Dodatni wynik badania serologicznego (przebyte, ostre lub przewlekłe zakażenie) stwierdziłam w grupie ZAO po 3 tygodniach od zaostrzenia objawów choroby u 36/39 (92%) dzieci, natomiast po 6 tygodniach u 37/39 (95%) dzieci, czyli istotnie statystycznie częściej niż w grupie kontrolnej 31/50 (62%) ( $p=0,001$ ).

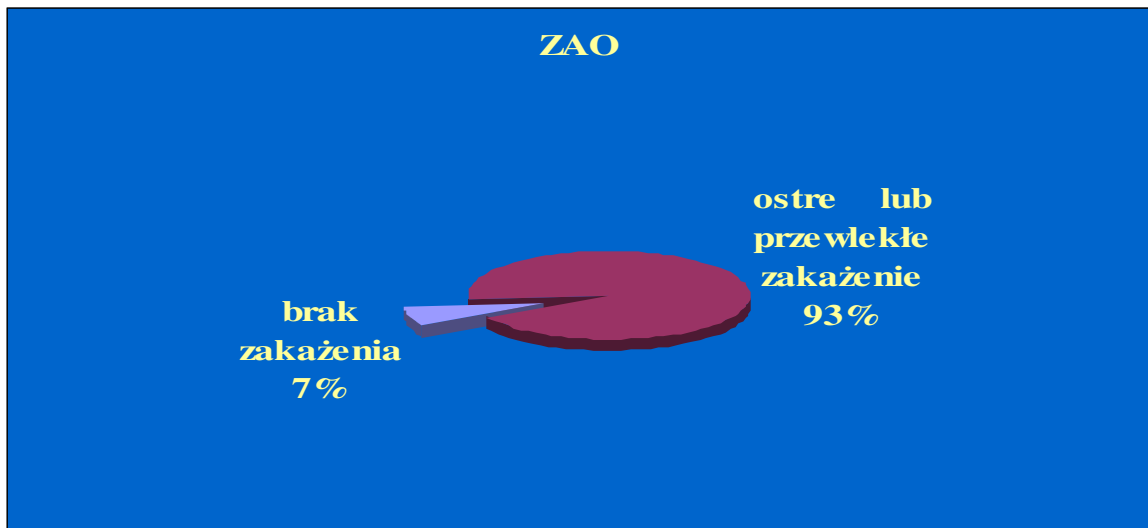
Wyłączając dzieci, które przebyły zakażenie w przeszłości (9 dzieci z grupy zaostrzenia AO i 6 dzieci z grupy kontrolnej) można zaobserwować, że w grupie zaostrzenia AO lic-

ba dzieci z ostrym lub przewlekłym zakażeniem była istotnie większa niż w grupie kontrolnej (93% vs 57%;  $p=0,001$ ) co przedstawia tabela 15 i rycina 12

**Tabela 15** Liczba dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) w porównaniu do grupy kontrolnej

	Zaostrzenie AO (n=30)	Kontrola (n=44)
Brak infekcji	2 (7%)	19 (43%)
Ostre lub przewlekłe zakażenie	28 (93%)	25 (57%)

**Ryc. 12** Odsetek dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) w porównaniu do grupy kontrolnej



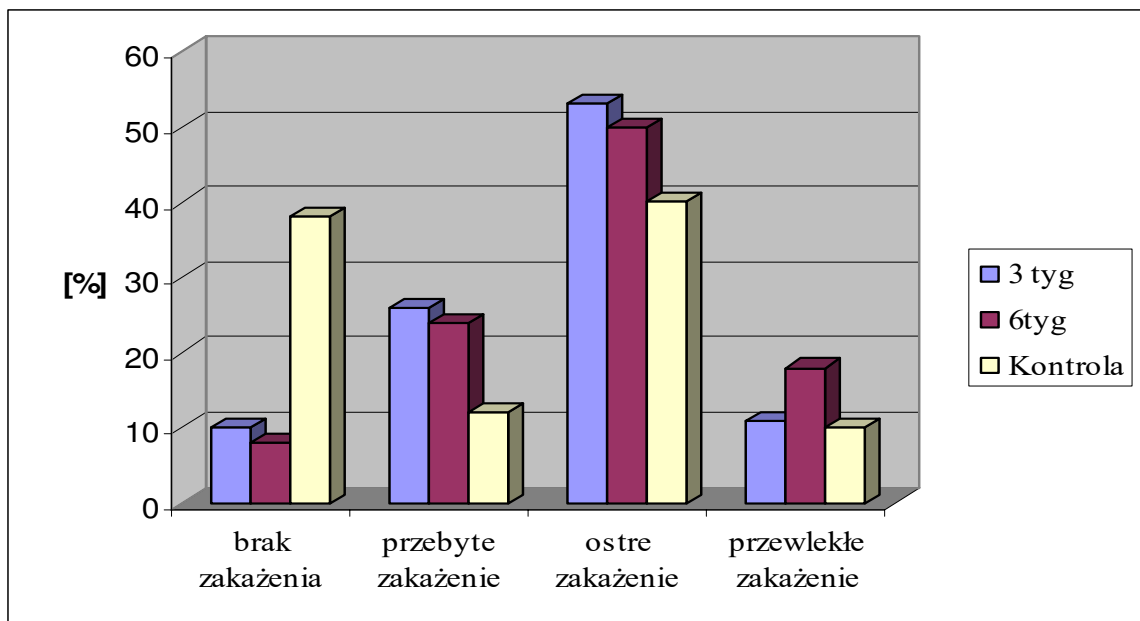


Wyniki badań serologicznych w 3 i 6 tygodniu od rozpoznania zaostrzenia objawów AO w grupie wszystkich dzieci z AO, u których rozpoznano co najmniej jeden epizod zaostrzenia (n=62) w porównaniu do grupy kontrolnej przedstawia tabela 16 i rycina 13.

**Tabela 16** Wyniki badań serologicznych w 3 i 6 tygodniu od rozpoznania zaostrzenia objawów astmy grupie wszystkich dzieci z AO i z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia choroby w porównaniu do grupy kontrolnej

	3 tygodnie od zaostrzenia objawów AO	6 tygodni od zaostrzenia objawów AO	Kontrola
Brak infekcji	6 (10%)	5 (8%)	19 (38%)
Przebyte zakażenie w przeszłości	16 (26%)	15 (24%)	6 (12%)
Ostre zakażenie	33 (53%)	31 (50%)	20 (40%)
Przewlekłe zakażenie	7 (11%)	11 (18%)	5 (10%)

**Ryc. 13** Wyniki badań serologicznych w 3 i 6 tygodniu od rozpoznania zaostrzenia astmy w grupie wszystkich dzieci z astmą i u dzieci z grupy kontrolnej



Liczba dzieci, u których stwierdzono dodatnie wyniki serologiczne (przebyte zakażenie, ostre lub przewlekłe zakażenie *Ch. pneumoniae*) po 3 tygodniach (56/62; 90%) jak i po 6 tygodniach (57/62; 92%) od zaostrzenia objawów astmy oskrzelowej była istotnie statystycznie większa w grupie dzieci z astmą, u których rozpoznano co najmniej 1 epizod zaostrzenia objawów choroby niż w grupie kontrolnej (31/50; 62%) ( $p=0,001$ )

Wyłączając dzieci, które przebyły zakażenie w przeszłości (15 dzieci z grupy zaostrzenia AO i 6 dzieci z grupy kontrolnej) można zaobserwować, że w grupie wszystkich dzieci z

AO i z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia choroby w trakcie obserwacji liczba dzieci z ostrym lub przewlekłym zakażeniem była istotnie większa niż w grupie kontrolnej (89% vs 57%;  $p=0,001$ ) co przedstawia tabela 17 i rycina 14.

**Tabela 17** Liczba dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie dzieci z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia objawów astmy w trakcie 24 tygodniowej obserwacji w porównaniu do grupy kontrolnej

	Zaostrzenie AO (n=47)	Kontrola (n=44)
Brak infekcji	5 (11%)	19 (43%)
Ostre lub przewlekłe zakażenie	42 (89%)	25 (57%)

**Ryc. 14** Odsetek dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie dzieci z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia objawów astmy w trakcie 24 tygodniowej obserwacji w porównaniu do grupy kontrolnej



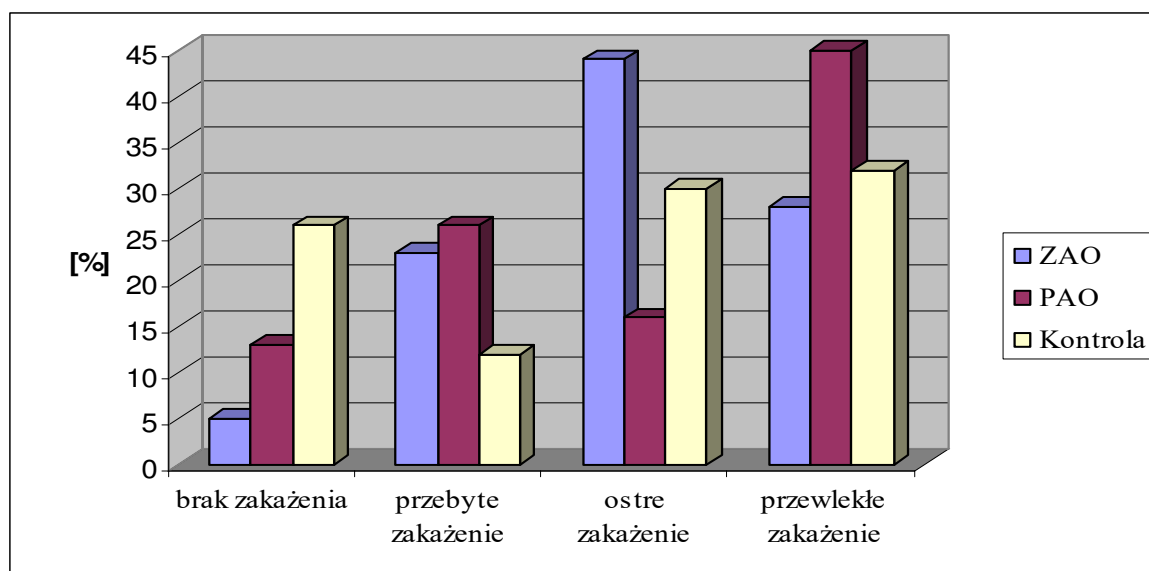
Zmianę wyników serologicznych po 24 tygodniach obserwacji w badanych grupach przedstawia tabela 18 oraz graficznie rycina 15.

**Tabela 18. Zmiana obserwowanych wyników serologicznych po 24 tygodniowej obserwacji w grupach badanych i kontrolnej**

	<b>ZAO</b>	<b>PAO</b>	<b>Kontrola</b>
Brak zakażenia patogenem przed badaniem i w trakcie 24 tygodniowej obserwacji:	2 (5%)	4 (13%)	13 (26%)
Przebyte zakażenie:	9 (23%)	8 (26%)	6 (12%)
Ostre zakażenie:	17 (44%)	5 (16%)	15 (30%)
Przewlekłe zakażenie	11 (28%)	14 (45%)	16 (32%)

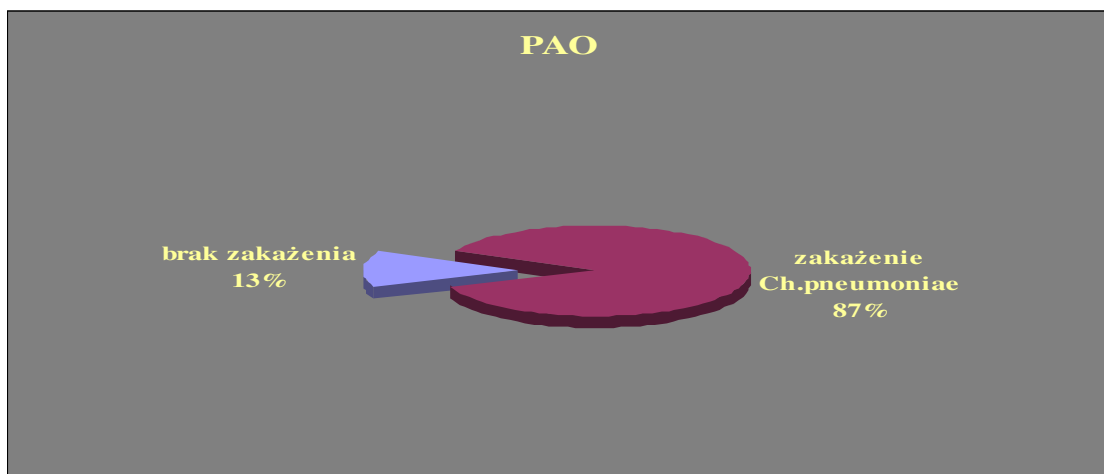
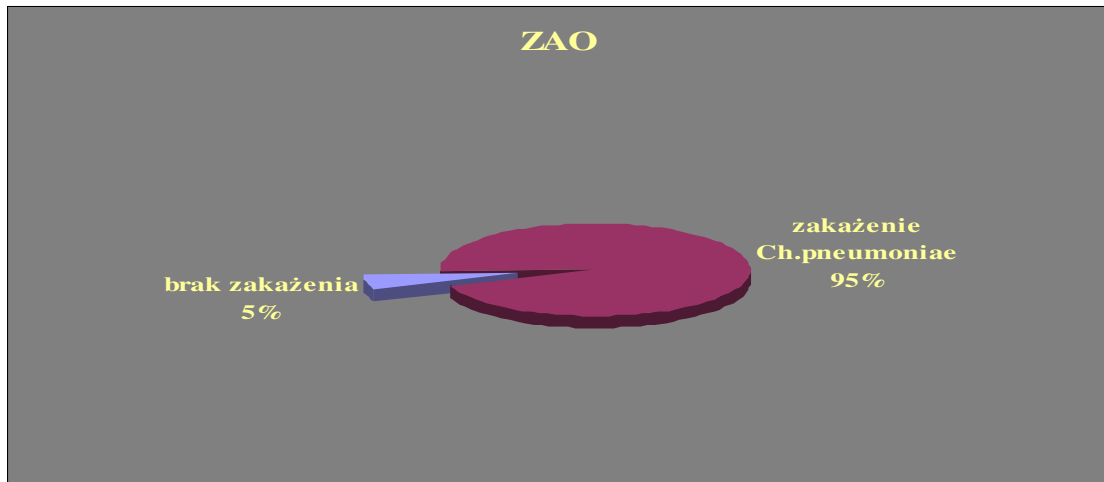
$p=0,02$  (test  $\chi^2$  Pearsona)

**Ryc. 15 Wyniki badań serologicznych w grupach badanych i kontrolnej po 24 tygodniach obserwacji**



Oceniając wyniki zawarte w tabeli 18 można zaobserwować, że po 24 tygodniach obserwacji:

- W obu grupach dzieci z astmą (ZAO i PAO), liczba pacjentów z dodatnim wynikiem serologicznym (przebyte, ostre i przewlekłe zakażenie) była istotnie statystycznie większa niż w grupie kontrolnej (95% vs 87% vs 74%;  $p=0,02$ ) co przedstawiłam na rycinie 16,

**Ryc. 16** Wyniki serologiczne w grupach badanych i kontrolnej po 24 tygodniowej obserwacji

- U dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) częściej niż w pozostałych grupach rozpoznawano serologiczne cechy ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* (44% vs 16% vs 30%; p=0,046)

Stwierdzono również pewne tendencje przy braku istotności statystycznej a mianowicie, że:

- W obu grupach dzieci z astmą w porównaniu do grupy kontrolnej częściej stwierdzano przebyte zakażenie w przeszłości (23% vs 26% vs 12%; p=0,1),
- U dzieci z przewlekłą astmą oskrzelową (PAO) częściej niż w pozostałych grupach badanych występowało zakażenie przewlekłe (45% vs 28% vs 32%; p=0,19)

Porównanie wybranych czynników klinicznych w grupie dzieci z AO, u których w okresie 24 tygodniowej obserwacji rozpoznano ostre zakażenie *Ch. pneumoniae* oraz w grupie dzieci z astmą, u których wszystkie wyniki badań serologicznych były ujemne (brak zakażenia patogenem) przedstawiłam tabela 19.

**Tabela 19. Porównanie wybranych czynników klinicznych w grupie dzieci z astmą i rozpoznany w trakcie obserwacji klinicznej ostrym i przewlekłym zakażeniem *Ch. pneumoniae* oraz dzieci z brakiem serologicznych cech zakażenia**

Grupa	Ostre i przewlekłe zakażenie <i>Ch. pneumoniae</i> (n=52)	Brak zakażenia (n=6)	P
Liczba dzieci, u których stwierdzono co najmniej 1 epizod zaostrzenia (n/%)	46 (88%)	4 (66%)	0,17 <sup>1</sup>
Liczba zaostrzeń (Me, 25-75 percentyl)	4 (2-5)	2 (0-4)	0,28 <sup>2</sup>
Liczba dzieci, u których istniała konieczność podania GKS doustnie (n/%)	13 (25%)	0 (0%)	0,17 <sup>1</sup>
Liczba hospitalizacji z powodu zaostrzenia AO (n/%)	13 (25%)	1 (16%)	0,96 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> – p dla testu dwustronnego Fishera

<sup>2</sup> – p dla testu U Manna-Whitney’a

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że zarówno ostre jak i przewlekłe zakażenie układu oddechowego wywołane przez *Ch. pneumoniae* jest istotnym czynnikiem zaostrzającym przebieg astmy oskrzelowej w obserwowanej przez mnie grupie dzieci.

Komura i wsp. w 2003 roku wykazali, że glikokortykosteroidy wziewne promują ostre zakażenie *Ch. pneumoniae* poprzez przesuwanie odpowiedzi Th1 – zależnej w kierunku odpowiedzi Th2 zależnej, która jest nieskuteczna jeżeli chodzi o kontrolę tego zakażenia oraz eliminację tego patogenu. Ta obserwacja mogłaby tłumaczyć wyniki przeprowadzonej w prezentowanym badaniu oceny związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy (ocenionym na podstawie zapotrzebowania na glikokortykosteroidy wziewne w przeliczeniu na budezonid) a występowaniem conajmniej jednego epizodu zaostrzenia choroby u chorego

dziecka z serologicznymi cechami ostrego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w trakcie 24 tygodniowej obserwacji - tabela 20.

**Tabela 20. Ocena związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy i występowaniem co najmniej jednego zaostrzenia choroby u chorego dziecka z cechami serologicznymi ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* w trakcie 24 tygodniowej obserwacji**

	<b>GKS 400 ug (n=34)</b>	<b>GKS&gt; 400 ug (n=11)</b>
Brak zakażenia	6 (18 %)	0 (0%)
Przebyte zakażenie	15 (44%)	2 (18%)
Ostre zakażenie	13(38%)	9 (82%)

p= 0,035 (test  $\chi^2$  Pearsona)

Po 24 tygodniach obserwacji pacjenci z astmą przewlekłą umiarkowaną i ciężką dłużej wykazywali serologiczne cechy ostrego zakażenia w porównaniu do pacjentów z astmą przewlekłą lekką (82% vs 38%, p=0,035), co mogłoby sugerować nie tylko słabszą eliminację tego patogenu, ale również silnie modulujący wpływ zakażenia na przebieg obserwowanego w astmie oskrzelowej zapalenia eozynofilowego.

Ważnymi klinicznymi wykładnikami zaostrzenia astmy oskrzelowej u dzieci są przyrost wartości FEF1 w teście bronchodilacyjnym 15% oraz zmienność dobową PEF ( $\Delta$ PEF) przekraczająca 20%. Analizując wpływ zakażenia *Chlamydia pneumoniae* na wyżej wymienione parametry zaobserwowano, że w dniu kwalifikacji do badania w grupie chorych dzieci (n=70) z przyrostem FEV1 >15% (n=24) i zmiennością dobową PEF > 20% (n=36) przeważały cechy serologiczne ostrego zakażenia tym patogenem (odpowiednio 42% i 44%), natomiast w grupie chorych dzieci z przyrostem FEV1 15% (n=46) oraz zmiennością dobową PEF 20% (n=34) przeważały cechy serologiczne przewlekłego zakażenia (odpowiednio 37% i 44%) przy braku istotności statystycznej, co przedstawiają tabele 21 i 22.

**Tabela 21. Ocena wpływu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w grupie badanej dzieci z astmą na przyrost wartości FEV1 w teście bronchodilacyjnym.**

	<b>Przyrost FEV1 15% w teście bronchodilacyjnym (n=46)</b>	<b>Przyrost FEV1 &gt; 15% w teście bronchodilacyjnym (n=24)</b>
<b>Brak zakażenia</b>	<b>5 (11%)</b>	<b>1 (4%)</b>
<b>Kontakt z patogenem</b>	<b>12 (26%)</b>	<b>5 (21%)</b>
<b>Ostre zakażenie</b>	<b>12 (26%)</b>	<b>10 (42%)</b>
<b>Przewlekłe zakażenie</b>	<b>17 (37%)</b>	<b>8 (33%)</b>

p= 0,51 (test  $\chi^2$  Pearsona)

**Tabela 22. Ocena wpływu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w grupie badanej dzieci z astmą na zmienność dobową PEF**

	<b>Zmienność dobową PEF 20% (n=34)</b>	<b>Zmienność dobową PEF &gt; 20% (n=36)</b>
<b>Brak zakażenia</b>	<b>4 (12%)</b>	<b>2 (6%)</b>
<b>Kontakt z patogenem</b>	<b>9 (26%)</b>	<b>8 (22%)</b>
<b>Ostre zakażenie</b>	<b>6 (18%)</b>	<b>16 (44%)</b>
<b>Przewlekłe zakażenie</b>	<b>15 (44%)</b>	<b>10 (28%)</b>

p= 0,10 (test  $\chi^2$  Pearsona)

Na podstawie przedstawionych wyników badania można stwierdzić, że:

1. Ostre i przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae* występuje znacznie częściej u dzieci chorych na astmę w porównaniu do dzieci zdrowych w grupie wiekowej od 7 do 15 lat.
2. Zakażenie *Chlamydia pneumoniae* jest istotnym czynnikiem zaostrzającym przebieg astmy u chorych dzieci w wieku od 7 do 15 lat.
3. Występowanie kolejnych zaostrzeń choroby u dzieci z astmą oskrzelową, u których stwierdza się serologiczne cechy ostrego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* jest zależne od stopnia zaawansowania tej przewlekłej choroby.
4. W przebiegu zakażenia dróg oddechowych *Chlamydia pneumoniae* u dzieci chorych na astmę obserwuje się w badaniach podstawowych znacznie wyższą eozynofilię względną w krwi obwodowej.

## 6. Dyskusja

W prezentowanym badaniu występowanie zakażenia *Ch. pneumoniae*, określonego serologicznie przyjęto za czynnik ryzyka występowania kolejnych zaostrzeń astmy u chorych dzieci w trakcie 24 tygodniowej obserwacji.

Badania serologiczne są obecnie metodą z wyboru w rutynowych procedurach laboratoryjno - klinicznych w diagnostyce zakażeń wywoływanych przez *Ch. pneumoniae* (73, 74, 76). Ogólnie przyjmuje się, że serologia jest stosowana w powikłaniach nawracających zakażeń chlamydialnych (195), w diagnostyce zakażeń *Ch. pneumoniae* u dzieci oraz diagnostyce mięczaka zakaźnego (85). Serologia jest również wartościowa jako narzędzie badań seroepidemiologicznych (93). Wraz z nastaniem swoistych, ilościowych i obiektywnych metod serologicznych, nasze rozumienie patogenезы związków między zakażeniami wywoływanymi przez mikroorganizmy atypowe a ciężkimi, uważanymi dotąd za nieinfekcyjne schorzeniami np. miażdżycą, astmą i POCHP nie tylko uległo zmianie, ale pozwoliło także na lepsze zrozumienie naturalnej historii tych przewlekłych schorzeń.

W latach 70-tych ubiegłego wieku została odkryta metoda mikroimmunofluorescencji (MIF) do diagnostyki serologicznie dodatnich zakażeń *Ch. trachomatis* (5, 49). Metoda MIF opiera się na badaniu mikroskopowym antygeny chlamydowego umocowanego na szklanych szkiełkach podstawowych jako oddzielne kropki. Reakcja immunologiczna jest wykrywana, gdy próbka surowicy pacjenta zawiera przeciwciała reagujące z antygenem. Uwidocznienie reakcji występuje poprzez użycie swoistych, wtórnych (antyludzkich) przeciwciał znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Metoda ta pozwala identyfikować odpowiedź immunologiczną w różnych klasach przeciwciał IgG, IgA i IgM oraz wykorzystuje miana – end-point uzyskiwane poprzez seryjne rozcieńczenia próbek.

Przez prawie trzy dekady metoda ta zachowała dowiedzioną pozycję jako „złoty standard” w diagnostyce zakażeń wywoływanych przez *Ch. pneumoniae*. Test MIF był kwalifikowany jako jedyna specyficzna i czuła próba dla wszystkich chlamydii (198). Z drugiej strony czułość i specyficzność standardowej metody MIF była sporadycznie kwestionowana (94). Należy jednak podkreślić, że większość stosowanych testów MIF jest metodami niestandardowymi, i dlatego w pewnym sensie nieco różniącymi się wykonaniem i jakością. Ta zmienność wyników MIF została przedstawiona w badaniu wewnątrzlaboratoryjnej zgodności i spowodowana była zmiennymi warunkami próby takimi jak: czas inkubacji próbek i konjugatu, jakością konjugatu, metod stosowanych w celu przygotowania antygeny, oczyszczania i utrwalania antygeny, obecnością lub brakiem lipopolisacharydu (LPS), trwałością i gęstością antygenowych kropek, jakością mikroskopu i w końcu umiejętnościami i opinią badacza (196).



Test mikroimmunofluorescencji pośredniej (MIF) był pierwszą metodą stosowaną w diagnostyce zakażeń *Ch. pneumoniae*. Od tego czasu uznaje się go za metodę referencyjną tzw. „złoty standard” mimo, że nie potwierdzono ani jego czułości ani swoistości hodowlą bakterii (49, 196). Wykazuje on szereg ograniczeń, najpoważniejszym z nich jest jednak bardzo subiektywny odczyt wyników. Wady tego testu zostały wykazane przez Peeling i współpracowników, którzy przesłali dwadzieścia dwie próbki surowicy do 14 laboratoriów. Każdy z uczestników wykonywał badanie według rutynowo stosowanej procedury. Zgodność wyników otrzymanych przez uczestniczące w cytowanym badaniu laboratoria wynosiła 80%. W następnym etapie badania wszyscy uczestnicy oznaczali obecność przeciwciał przeciw *Ch. pneumoniae* w badanych surowicach tym samym komercyjnym testem MIF, co nie zmniejszyło jednak rozbieżności w wynikach oznaczenia. Zgodność w wynikach badania poziomu przeciwciał między laboratoriami wynosiła w klasie IgM 80-100%, a w klasie IgG 60-100%. Podobnie Lieberman i wsp. nie wykazali korelacji pomiędzy zakażeniem *Ch. pneumoniae* a ostrymi objawami astmy w klinicznie kontrolowanym badaniu przy użyciu metod serologicznych. Niemniej jednak niepodważalnymi walorami tego testu jest wykorzystanie oczyszczonych ciałek elementarnych jako antygenów diagnostycznych i możliwość oznaczania obecności przeciwciał jednocześnie dla trzech gatunków z rodziny *Chlamydiaceae* (5, 49, 196).

Przeciwciała przeciw *Ch. pneumoniae* są wykrywane u 50-80% dorosłych zbadanych na całym świecie. W badaniach seroepidemiologicznych przeprowadzonych na ludziach zdrowych w Finlandii, obejmujących wszystkie grupy wiekowe, od dzieci 2 letnich do dorosłych powyżej 60 roku życia, przeciwciała dla *Ch. pneumoniae* wykryto u 6% dzieci w grupie wiekowej 2-4 lata, u 70% nastolatków, 50% osób w wieku 20-30lat i 70-80% powyżej 30 roku życia. *Ch. pneumoniae* jest przyczyna 5-20% pozaszpitalnych zapaleń płuc zarówno u dzieci jak i u dorosłych. Wzrost występowania przeciwciał dla *Ch. pneumoniae* wraz z wiekiem sugeruje, że prawie każdy człowiek, przynajmniej raz w życiu, przebył zakażenie tym drobnoustrojem (5, 10).

Wiadomo już, że zakażenie *Ch. pneumoniae* może odgrywać ważną rolę w patogenezie i przebiegu astmy, co przy dzisiejszym stanie wiedzy postrzega się dwojako:

- zakażenie *Ch. pneumoniae* może być współczynnikiem sprawczym powodującym pojawienie się objawów astmy u osób uprzednio zdrowych.
- zakażenie *Ch. pneumoniae* może zaostrzać przebieg choroby u osób z rozpoznąną wcześniej astmą.

W 1989 roku. Fryden i wsp. jako pierwsi opisali związek między zakażeniem *Ch. pneumoniae* a wystąpieniem objawów astmy (1, 4, 49). Związek patogenetyczny pomiędzy zakażeniem *Ch.pneumoniae* a pojawieniem się objawów astmy opisał po raz pierwszy w 1991

roku Hahn i wsp. Jako pierwsi donieśli o silnej korelacji między udowodnionym serologicznie zakażeniem *Ch. pneumoniae* a nagłym zaostrzeniem przebiegu astmy młodocianych oraz o złagodzeniu objawów lub uzyskaniu remisji tej choroby u badanych pacjentów po leczeniu makrolidami (164). W następnych latach pojawiły się kolejne prace dokumentujące rolę zakażenia tym patogenem w rozwoju astmy zarówno dorosłych, jak i astmy dziecięcej. U niektórych chorych *Ch.pneumoniae* posiada zdolność do stymulowania wytwarzania przeciwciał klasy IgE. Obecność przeciwciał klasy IgE skierowanych przeciwko antygenom *Ch.pneumoniae* wykazano u 85% osób z astmą i dodatnimi wynikami posiewów w kierunku tego drobnoustroju. Obserwacje te przemawiają za tym, że czynnik infekcyjny może wywoływać odpowiedź immunologiczną o przebiegu zbliżonym do reakcji atopowych. Jest prawdopodobne, że obecność swoistych skierowanych przeciwko *Ch.pneumoniae* przeciwciał klasy IgE może podtrzymywać przewlekłe zakażenie i prowadzić do przebudowy (ang. remodelingu) dróg oddechowych. Odkrycia te zostały potwierdzone w kolejnych badaniach klinicznych przeprowadzonych przez zespoły Cunnigham i Allegry (49).

W latach 90-tych ubiegłego stulecia opublikowano wiele obserwacji na podstawie, których można doszukać się związku patogenetycznego pomiędzy zaostrzeniem astmy a ostrym zakażeniem dróg oddechowych wywołanym przez *Ch.pneumoniae*. Wykazano m.in. zdolność chlamydii do uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych, unieruchamiania i destrukcji aparatu rzęskowego, co poprzez wzrost ekspozycji położonych podnabłonkowo zakończeń nerwowych na substancje drażniące i alergeny nasila nadreaktywność oskrzeli (165, 166, 167, 174, 178, 179).

Ponadto wiadomo już, że Chlamydia zaburzą funkcjonowanie makrofagów, nasilając zależną od IgE odpowiedź alergiczną na wziewne alergeny oraz torują drogę dla dodatkowych zakażeń (wirusowych i bakteryjnych) przez co mogą zapoczątkowywać zapalenie oskrzeli i płuc, które są znaczącym czynnikiem ryzyka w rozwoju astmy oskrzelowej u dzieci (49, 54, 182, 183, 184, 188, 189)

W fińskich badaniach populacyjnych wśród osób chorych na astmę stwierdzono, że w każdej z badanych grup wiekowych wzrost odsetka osób z dodatnimi wynikami badań serologicznych w kierunku zakażenia *Ch. pneumoniae* wiązał się nieodłącznie ze zwiększeniem częstości występowania zaostrzeń astmy(49).

W wyniki wielu badań epidemiologicznych i klinicznych z ostatnich lat wiążą ostre zakażenie tym patogenem z indukowaniem i wywoływaniem zaostrzeń astmy oskrzelowej zwłaszcza u dzieci (151, 152, 157, 159, 160, 169, 171, 176, 180)

Obecność *Ch. pneumoniae* Kraft i wsp. wykazali w drogach oddechowych u 11% dzieci trafiających do szpitala z powodu zaostrzenia astmy (dla porównania w grupie kontrolnej 4,9%, przy czym dzieci te nie miały objawów astmy) (177).

Z kolei Emre i wsp. wykazali nie tylko ścisły związek pomiędzy zakażeniem *Ch. pneumoniae* a ciężkością przebiegu astmy u dzieci, ale również opisali obecność przeciwciał w klasie IgE przeciwko *Ch. pneumoniae* u dzieci z obturacją oskrzeli (158).

Ciekawe obserwacje poczynił także zespół Cunningham, wykrywając *Ch. pneumoniae* w wydzielinie z nosa metodą PCR u 28% dzieci w wieku 9-11 lat z zaostrzeniem astmy oraz obserwując częstsze zaostrzenia choroby u pacjentów z przewlekłym zakażeniem tym drobnoustrojem (wysokie miana IgA przeciw *Ch. pneumoniae*) w okresie 12 miesięcznej obserwacji po wykryciu zakażenia (157, 159). Z kolei Biscione i współ. wykazali obecność *Chlamydia pneumoniae* (met PCR-DNA w wydzielinie nosowej) aż u 37% dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej obturacji oskrzeli występującej w przebiegu astmy oskrzelowej, zapalenia oskrzelików lub zapalenia płuc (152). W podobnej pracy Kocabas i wsp. stwierdzili serologiczne cechy ostrego zakażenia tym drobnoustrojem u 27% dzieci z astmą, sugerując związek przyczynowy między ostrym zakażeniem *Ch. pneumoniae* a zaostrzeniem choroby (176). W 1995 roku Hahn i McDonald wykazali obecność *Ch.pneumoniae* w drogach oddechowych (na podstawie badań serologicznych i/lub posiewu) u 12 % pacjentów leczonych z powodu pierwszego w życiu napadu duszności bronchospastycznej lub zaostrzenia świeżo rozpoznanej astmy.(49)

We wszystkich cytowanych tutaj badaniach do wykazania odpowiedzi immunologicznej przeciw zakażeniu *Ch. pneumoniae* była wykorzystywana metoda mikroimmunofluorescencyjna (MIF) (28, 49).

W prezentowanych przeze mnie wynikach badania, stwierdziłam znamienne większą do cytowanej piśmiennictwie częstość zakażenia omawianym patogenem.

Po 24 tygodniach obserwacji w grupach badanych, dzieci z astmą o zaostrzonym (ZAO) i przewlekłym (PAO) przebiegu, liczba pacjentów z dodatnim wynikiem serologicznym wskazującym na zakażenie *Ch. pneumoniae*, była istotnie statystycznie większa niż w grupie kontrolnej dzieci bez chorób alergicznych (95% vs 87% vs 74%; p=0,02).

Ponadto u dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) częściej niż w pozostałych grupach rozpoznawałam serologiczne cechy ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* (44% vs 16% vs 30%; p=0,046).

Liczba dzieci z astmą i serologicznymi cechami zakażenia *Ch. pneumoniae*, u których stwierdziłam conajmniej jeden epizod zaostrzenia objawów choroby w trakcie 24 tygodniowej obserwacji była również znacząco większa w grupie dzieci z zaostrzeniem AO niż w grupie dzieci z przewlekłą AO (ZAO/PAO: 97% vs 68%; p = 0,01).

Podobnie w badanej przez mnie grupie dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) częściej niż w pozostałych grupach (PAO i kontrolnej) rozpoznałam serologiczne cechy ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* (44% vs 16% vs 30%;  $p=0,046$ ). Liczba dzieci z ostrym lub przewlekłym zakażeniem w grupie wszystkich dzieci z astmą ( $n=62$ ) i z rozpoznany co najmniej jednym epizodem zaostrzenia choroby w trakcie obserwacji była istotnie większa niż w grupie kontrolnej (89% vs 57%;  $p=0,001$ ).

Znamiennie większa liczba dzieci chorych na astmę, ze stwierdzonymi serologicznie cechami zakażenia *Ch. pneumoniae* w obserwowanej przez mnie grupie chorych w porównaniu do podawanej w piśmiennictwie może wynikać z faktu, że okres obserwacji pacjentów w moim badaniu przypadają na miesiące, kiedy zakażenie tym patogenem jest najczęstsze czyli październik, listopad, grudzień oraz marzec i kwiecień (54).

Jedną z koncepcji wyjaśniającą wpływ ostrego zakażenia tym patogenem na pogorszenie przebiegu klinicznego astmy wskazuje na podobieństwo chlamydiovych białek szoku termicznego z ludzkimi. W chorobach układu oddechowego wywołanych przez *Ch. pneumoniae* następujące po sobie kolejne ostre lub nawracające zakażenia, przechodzące z czasem w zakażenie przewlekłe mogą być przyczyną intensywnego przewlekłego zapalenia eozynofilowego. Uszkodzenie tkanek gospodarza jest związane zarówno ostrym jak i przewlekłym zakażeniem, w przebiegu którego *Ch. pneumoniae* uwalnia białka szoku termicznego (Hsp60 i Hsp10) wywołujące silną odpowiedź zapalną w zakażonym organizmie (30, 45, 64). Występowanie takiej korelacji u astmatyków wykazał w swoim badaniu m.in. von Hertzen (97). Pacjenci z przewlekłym i ciężkim zakażeniem *Ch. pneumoniae* wykazują obniżony poziom odporności komórkowej, obniżone wydzielanie INF i podwyższoną odpowiedź humoralną w klasie przeciwciał IgE w porównaniu do osób bez tego zakażenia, co może sugerować dominującą Th2-zależną odpowiedź u tych osób (1, 178).

W moim badaniu stwierdziłam podobne tendencje przy braku istotności statystycznej a mianowicie, w obu grupach dzieci z astmą oskrzelową (ZAO i PAO) w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej częściej występowały cechy serologiczne przebytego w przeszłości zakażenia *Ch. pneumoniae* (23% vs 26% vs 12%;  $p=0,1$ ). Ponadto u dzieci z przewlekłą astmą oskrzelową (PAO) częściej niż w pozostałych grupach badanych występowało zakażenie przewlekłe (45% vs 28% vs 32%;  $p=0,19$ ).

W porównaniu z innymi patogenami wywołującymi zakażenia układu oddechowego, kliniczne i epidemiologiczne powiązania zakażenia *Ch. pneumoniae* z zaostrzeniami przebiegu astmy oskrzelowej są rozległe (166, 173, 174, 176). *Ch. pneumoniae* wywołuje ciliostazę czyli zahamowanie funkcji nabłonka rzęsatych dróg oddechowych, stymuluje odpowiedź immunologiczną Th2-zależną z uwalnianiem cytokin prozapalnych (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-16, TNF alfa) nasilających eozynofilowe zapalenie w drogach oddechowych a

tym samym wpływa niekorzystnie na przebieg astmy u zakażonego dziecka chorego na astmę oskrzelową (30). Jednym z wykładników nasilającego się eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w przebiegu zakażenia *Ch. pneumoniae* może być podwyższenie bezwzględnej liczba eozynofili we krwi obwodowej (49).

Podobną obserwację dokonałam w grupie dzieci z astmą oskrzelową, gdzie po wykluczeniu infestacji pasożytniczej omawiany parametr badań podstawowych był istotnie podwyższony głównie w grupie dzieci z zaostrzeniem astmy oskrzelowej (ZAO) w porównaniu do pozostałych grup ( $p < 0,001$ ).

W oparciu o zgromadzone dotychczas dowody wydaje się, że zakażenie *Chlamydia pneumoniae* może brać udział zarówno w zapoczątkowywaniu, nasilaniu, jak i podtrzymywaniu procesu alergicznego w drogach oddechowych. Nie można także wykluczyć hipotezy, iż na skutek istniejących zaburzeń równowagi immunologicznej tj. dotyczącej przewagi czynnościowej limfocytów typu Th2 i odpowiedzi humoralnej u chorych na astmę, łatwiej dochodzi do zakażenia tymi drobnoustrojami lub też występuje zjawisko upośledzonej eliminacji patogenu przez chorego, co prowadzi do niekorzystnego oddziaływania zakażenia na przebieg choroby (163, 178, 179, 181, 186, 187, 194).

Narastająca liczba dowodów wskazuje na korelację zakażenia dróg oddechowych tym patogenem a rozwojem zaostrzeń w przebiegu przewlekłej astmy oskrzelowej. *Ch. pneumoniae* jest zdolna do wzrostu i namnażania w komórkach układu oddechowego (w tym w komórkach nabłonkowych, makrofagach pęcherzykowych, komórkach mięśniówki gładkiej oraz komórkach śródbłona naczyniowego).

Poza tym w wielu badaniach klinicznych wykazano znaczącą korelację pomiędzy stopniem ciężkości astmy oskrzelowej a zakażeniem *Ch. pneumoniae* potwierdzonym zarówno metodami serologicznymi (narastaniem miana przeciwciał klasy IgG i IgM) jak i badaniem PCR (181).

Grupę szczególnego ryzyka przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* mogą stanowić dzieci i dorośli z astmą przewlekłą, którzy są leczeni często doustnymi glikokortykosteroidami (kilkudniowe „wstawki” przy zaostrzeniu choroby) oraz przypadki astmy ciężkiej przebiegającej z częstymi zakażeniami dróg oddechowych i równie częstym stosowaniem (nadużywaniem) antybiotyków (być może niemakrolidowych).

Wziewne glikokortykosteroidy są jedynymi najskuteczniejszymi lekami o działaniu przeciwzapalnym stosowanymi w terapii astmy, które ograniczają odpowiedź zapalną i eozynofilię u pacjentów chorych na astmę oskrzelową. Komura i wsp. w 2003 roku wykazali, że glikokortykosteroidy wziewne promują ostre zakażenie *Ch. pneumoniae* poprzez przesuwanie odpowiedzi Th1 – zależnej w kierunku odpowiedzi Th2 zależnej, która jest nieskuteczna jeżeli chodzi o kontrolę tego zakażenia oraz eliminację tego patogenu (15).

Ta obserwacja mogłaby tłumaczyć wyniki przeprowadzonej w prezentowanym badaniu oceny związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy oskrzelowej (ocenionym na podstawie zapotrzebowania na glikokortykosteroidy wziewne w przeliczeniu na budezonid) a występowaniem conajmniej jednego epizodu zaostrzenia choroby u chorego dziecka z serologicznymi cechami ostrego zakażenia *Chlamydia pneumoniae*.

Po 24 tygodniach obserwacji pacjenci z astmą przewlekłą umiarkowaną i ciężką (wymagający > 400 ug glikokortykosteroidów wziewnych w przeliczeniu na budezonidu) dłużej wykazywali serologiczne cechy ostrego zakażenia w porównaniu do pacjentów z astmą przewlekłą lekką (82% vs 38%,  $p=0,035$ ), co mogłoby sugerować nie tylko słabszą eliminację tego patogenu, ale również silnie modulujący wpływ tego zakażenia na przebieg obserwowanego w astmie oskrzelowej zapalenia eozynofilowego.

Ważnymi klinicznymi wykładnikami zaostrzenia astmy oskrzelowej u dzieci są przyrost wartości FEF1 w teście bronchodilacyjnym 15% oraz zmienność dobową PEF ( $\Delta$ PEF) przekraczająca 20%. Analizując wpływ zakażenia *Chlamydia pneumoniae* na wyżej wymienione parametry zaobserwowano pewne tendencje (przy braku istotności statystycznej), że w dniu kwalifikacji do badania w grupie chorych dzieci ( $n=70$ ) z przyrostem FEV1 >15% ( $n=24$ ) i zmiennością dobową PEF > 20% ( $n=36$ ) przeważały cechy serologiczne ostrego zakażenia tym patogenem (odpowiednio 42% i 44%), natomiast w grupie chorych dzieci z przyrostem FEV1 15% ( $n=46$ ) oraz zmiennością dobową PEF 20% ( $n=34$ ) przeważały cechy serologiczne przewlekłego zakażenia (odpowiednio 37% i 44%).

Problemem związku między zakażeniem *Ch. pneumoniae* a rozwojem astmy u dzieci zajmował się także Biscardi i wsp., którzy wykazali możliwość związku pomiędzy ostrym zakażeniem tym patogenem a pierwszym ciężkim zaostrzeniem astmy oskrzelowej wymagającym hospitalizacji. Ponadto dzieci z tym zakażeniem miały częstsze nawroty astmy w porównaniu do grupy bez zakażenia, co potwierdziło uprzednie obserwacje Esposito i wsp.(160).

Istotnie zatem, zakażenie *Ch. pneumoniae* może być związane z przewlekłymi i ostrymi objawami astmy oskrzelowej, ale nie powinno się jeszcze wyciągać ostatecznych wniosków, czy indukuje ono odpowiedź Th2 - zależną a tym samym predysponuje do wystąpienia objawów astmy jak proponował w 1998 roku zespół Cunningham (194).

Z powyższych hipotez zrodziły się próby kontroli astmy poprzez eradykację zakażenia *Ch. pneumoniae* antybiotykami makrolidowymi. W 2001 roku opublikowano wyniki pierwszego kontrolowanego badania na temat wpływu roksytromycyny na przebieg astmy oskrzelowej u chorych zakażonych *Ch. pneumoniae*. Po 6 tygodniach terapii makrolidem autorzy wykazali poprawę wartości szczytowego przepływu wydechowego (choć efekt

ten nie był trwały), przy braku zmian w nasileniu objawów klinicznych i zużyciu leków „na żądanie”. Eposito i wsp. udokumentowali skuteczność terapii makrolidem w przebiegu klinicznym astmy w okresie 3 miesięcy po zastosowanej antybiotykoterapii – dzieci leczone antybiotykiem demonstrowały mniej zaostrzeń choroby w porównaniu do pacjentów z grupy kontrolnej, u których nie stosowano antybiotykoterapii (95). Podobne wnioski wypływają z pracy Krafta i wsp., którzy stwierdzili wyraźną poprawę przebiegu astmy po wielotygodniowej terapii klarytromycyną u chorych przewlekle zakażonych omawianym patogenem(118).

Wyniki badań prowadzonych różnymi metodami na całym świecie dowodzą ważnej roli zakażenia *Ch. pneumoniae* w patogenezie i klinicznym przebiegu astmy oskrzelowej u dzieci, wskazując jednocześnie na makrolidy, jako potencjalne leki przeciwzapalne i przeciwastmatyczne.

## 7. Wnioski

1. Zakażenie *Chlamydia pneumoniae* jest istotnym czynnikiem zaostrzającym przebieg astmy u chorych dzieci w wieku od 7 do 15 lat.
2. Dzieci chore na astmę w wieku 7 – 15 lat wykazują znamienne częściej serologiczne cechy ostrego i przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w stosunku do dzieci z grupy kontrolnej.
3. Przedłużona obecność serologicznych cech ostrego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u pacjentów z astmą przewlekłą umiarkowaną i ciężką oraz nawracającymi zaostrzeniami choroby może wskazywać na słabą eliminację tego patogenu warunkowaną stosowanym leczeniem przeciwzapalnym.
4. W przebiegu zakażenia dróg oddechowych *Chlamydia pneumoniae* u dzieci chorych na astmę obserwuje się w badaniach podstawowych znamienne wyższą eozyfilię bezwzględną w krwi obwodowej.



## 8. Streszczenie

Celem prezentowanego badania było określenie częstości występowania zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u dzieci chorych na astmę i dzieci zdrowych w wieku od 7 do 15 lat oraz określenie związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy i występowaniem kolejnych zaostrzeń choroby u chorego dziecka z zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* określonym na podstawie badań serologicznych.

Badanie przeprowadzono na grupie 120 dzieci w wieku od 7 do 15 lat, w tym 50 dziewczętach i 70 chłopcach. Dzieci zostały podzielone na trzy grupy:

- grupę pacjentów z zaostrzeniem astmy (ZAO) – tworzyło 39 dzieci,
- grupę z przewlekłymi objawami astmy (PAO) – tworzyło 31 dzieci,
- grupę kontrolną – tworzyło 50 zdrowych dzieci.

Materiał do badań stanowiły próbki surowicy krwi pobierane w badanych grupach według przygotowanego schematu, pozwalającego śledzić dynamikę narastania przeciwciał w okresie 6 miesięcznej obserwacji dzieci chorych na astmę, a następnie uzyskane wyniki badań serologicznych oceniających rodzaj zakażenia u danego pacjenta chorego na astmę skorelować z liczbą obserwowanych u niego w tym czasie zaostrzeń choroby. Natomiast badania serologiczne w grupie dzieci zdrowych tworzących grupę kontrolną pozwoliły na porównanie częstości zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w grupie dzieci w wieku 7 do 15 lat.

W prezentowanym badaniu do wykazania odpowiedzi immunologicznej przeciw zakażeniu *Chlamydia pneumoniae* (w klasach IgM, IgA i IgG przeciwciał) wykorzystana została metoda mikroimmunoflorescencyjna (MIF) przy użyciu zestawów testów: *Ch.pneumoniae Micro-IF Test* firmy ANI – Labsystems, Finlandia. Wszystkie badania serologiczne metodą mikroimmunofluorescencyjną były wykonywane w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Biotycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (opinia nr KBET/113/B/2000).

Analizy statystycznej uzyskanych danych dokonano przy użyciu komputerowych programów statystycznych: Statistica 6.0 PL (StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA for Windows) oraz StatsDirect for Windows (2001).

Różnice i zależności uznano za istotne statystycznie, jeżeli prawdopodobieństwo odrzucenia prawdziwej hipotezy zerowej wynosiło mniej niż 5% ( $p < 0,05$ ).

Na podstawie przeanalizowanych wyników badań podstawowych wykonanych w dniu kwalifikacji dzieci do badania stwierdzono, że w grupie badanej leukocytoza mieściła się w granicach normy, ale była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Po-

dobnie eozynofilia krwi obwodowej (oceniana na podstawie bezwzględnej liczby eozynofili na  $\text{mm}^3$  krwi) była znamienne wyższa w grupie badanej niż kontrolnej ( $p < 0,001$ ).

W trakcie 24 tygodniowej obserwacji wśród dzieci z astmą oskrzelową stwierdzono 253 epizody zaostrzenia choroby, których liczba była istotnie większa w grupie dzieci z zaostrzeniem astmy oskrzelowej w dniu kwalifikacji do badania (ZAO) w porównaniu do grupy dzieci bez objawów zaostrzenia (PAO).

Dodatni wynik badania serologicznego (przebyte, ostre lub przewlekłe zakażenie) stwierdzono w grupie ZAO po 3 tygodniach od zaostrzenia objawów choroby u 36/39 (92%) dzieci, natomiast po 6 tygodniach u 37/39 (95%), czyli statystycznie częściej niż w grupie kontrolnej (62%) ( $p = 0,001$ ). Po wyłączeniu z analizy dzieci, które przebyły zakażenie w przeszłości (9 dzieci z grupy ZAO i 6 dzieci z grupy kontrolnej), zaobserwowano również, że w grupie ZAO liczba dzieci z ostrym i przewlekłym zakażeniem była istotnie większa niż w grupie kontrolnej (28/30; 93% vs 25/44; 57%;  $p = 0,001$ ).

Wyniki badań serologicznych pobranych w 3 i 6 tygodniu od rozpoznania zaostrzenia objawów astmy u dzieci z grup badanych (ZAO i PAO), u których rozpoznano conajmniej jeden epizod zaostrzenia ( $n = 62$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej pozwoliły stwierdzić, że liczba dzieci chorych u których stwierdzono dodatnie wyniki serologiczne (przebyte zakażenie, ostre lub przewlekłe zakażenie *Ch. pneumoniae*) po 3 tygodniach (56/62) jak i po 6 tygodniach (57/62) od zaostrzenia objawów astmy była istotnie statystycznie większa w grupie badanej niż w grupie kontrolnej (31/50) (90%, 92% vs 62%;  $p = 0,001$ ).

Natomiast wyniki badań serologicznych wykonanych po zakończeniu 24 tygodniowej obserwacji pozwoliły wyciągnąć następujące wnioski:

- w obu grupach dzieci z astmą oskrzelową (ZAO i PAO), liczba pacjentów z dodatnim wynikiem serologicznym była istotnie statystycznie większa niż w grupie kontrolnej (95% vs 87% vs 74%;  $p = 0,02$ ),

- u dzieci z zaostrzeniem objawów astmy oskrzelowej (ZAO) częściej niż w pozostałych grupach rozpoznawano serologiczne cechy ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* (44% vs 16% vs 30%;  $p = 0,046$ )

Analiza uzyskanych wyników badań serologicznych w kierunku zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w grupie dzieci z astmą przewlekłą (PAO) w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej wykazała, że w grupie PAO mniejsza liczba dzieci prezentowała cechy serologiczne ostrego zakażenia tym patogenem w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej (PAO/K: 26% vs 40%), natomiast częstość zakażenia przewlekłego była porównywalna w obu grupach (PAO/K: 19% vs 10%) w chwili kwalifikacji do badania.

Podjęta w badaniu próba oceny związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy oskrzelowej (określonej na podstawie zapotrzebowania na glikokortykosteroidy wziewne) a występo-

waniem kolejnych zaostrzeń choroby u chorego dziecka z cechami serologicznymi ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* wykazała taką zależność. Po 24 tygodniach obserwacji pacjenci z astmą przewlekłą umiarkowaną i ciężką dłużej wykazywali serologiczne cechy ostrego zakażenia w porównaniu do pacjentów z astmą przewlekłą lekką (82% vs 38%,  $p=0,035$ ), co mogłoby sugerować nie tylko słabszą eliminację tego patogenu, ale również silnie modulujący wpływ tego zakażenia na przebieg obserwowanego w astmie oskrzelowej zapalenia eozynofilowego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:

- Ostre i przewlekłe zakażenie *Chlamydomphila (Chlamydia) pneumoniae* występuje znacznie częściej u dzieci chorych na astmę w porównaniu do dzieci zdrowych w grupie wiekowej od 7 do 15 lat.
- Zakażenie *Chlamydia pneumoniae* jest istotnym czynnikiem zaostrzającym przebieg astmy u chorych dzieci w wieku od 7 do 15 lat.
- Przedłużona obecność serologicznych cech ostrego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u pacjentów z astmą przewlekłą umiarkowaną i ciężką oraz nawracającymi zaostrzeniami choroby może wskazywać na słabą eliminację tego patogenu uwarunkowaną stosowanym leczeniem przeciwzapalnym.
- W przebiegu zakażenia dróg oddechowych *Chlamydia pneumoniae* u dzieci chorych na astmę obserwuje się w badaniach podstawowych znamienne wyższą eozynofilię bezwzględną w krwi obwodowej.

## 9. Summary

The objective of the presented study was to determine the prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infections in children with asthma and in healthy children aged 7-15 years, as well as to define the association between the severity of asthma and episodes of disease exacerbation in children with *Chlamydia pneumoniae* infections determined based on serological tests.

The investigation was carried out in 120 children aged 7-15 years; the group included 50 girls and 70 boys. The children were divided into three groups:

- patients with asthma exacerbation (AE) – 39 children,
- patients with chronic asthma (CA) – 31 children,
- controls (C) – 50 healthy children.

The material consisted of blood serum samples collected as per the protocol allowing for following the dynamic changes in antibody level increase in children with asthma over a 6-month follow-up period. The results of serological tests determining the type of infection encountered in a given patient with asthma were then correlated with the number of disease exacerbation episodes observed during the follow-up. Serological tests performed in the control group consisting of healthy children allowed for comparing the prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in children aged 7-15 years.

To demonstrate the immune response against *Chlamydia pneumoniae* infections (IgM, IgA and IgG antibodies), the author employed the microimmunofluorescence method (MIF) using the *Ch. pneumoniae Micro-IF Test* manufactured by ANI-Labsystems, Finland. All the serological tests employing the MIF method were performed at the Chair and Department of Microbiology, Silesian Medical Academy in Katowice. The investigations were approved by the Bioethics Commission, Jagiellonian University, Cracow (permission No. KBET/113/B/2000).

The statistical analysis of the results was performed using the following software: Statistica 6.0 PL (StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA for Windows) and StatsDirect for Windows (2001).

The differences and correlations were regarded significant if the likelihood of rejecting the true null hypothesis was below 5% ( $p < 0.05$ ).

The analysis of results of basic tests performed on the day the children were qualified for the study revealed that in the experimental group, the white blood cell count was within normal limits, being, nevertheless, significantly higher as compared to the controls ( $p < 0.001$ ). Similarly, the eosinophilic leukocyte count in peripheral blood determined based on the absolute number of eosinophils per  $\text{mm}^3$  of blood was significantly higher in the experimental group as compared to the control subjects ( $p < 0.001$ ).

Over the 24-week follow-up, the children with bronchial asthma suffered from 253 episodes of disease exacerbation, and this number was significantly higher in children with exacerbated asthma on the day of recruitment to the study (AE) as compared to the group without signs of exacerbation (CA).

Positive serology results (acute or chronic infections) were observed in the AE group 3 weeks after exacerbation of the disease in 36/39 (92%) children, while after 6 weeks, it was seen in 37/39 (95%) patients; the prevalence of positivity was, thus, statistically more significant as compared to the controls (62%) ( $p=0.001$ ). When children with past infections were excluded from the analysis (9 children from the AE group and 6 children from the controls), the number of children with acute and chronic infections in the AE group proved to be significantly higher when compared to the controls (28/30; 93% vs. 25/44; 57%;  $p=0.001$ ).

Serological results obtained in material collected in week 3 and 6 following the diagnosis of asthma exacerbation in children from the experimental groups (AE and CA), in whom at least one exacerbation episode was detected ( $n=62$ ) as compared to the controls, allowed for determining that the number of children with positive serology (past infection, acute or chronic *Ch. pneumoniae* infection) after 3 weeks (56/62), as well as after 6 weeks (57/62) following the exacerbation episode was significantly higher in the experimental group as compared to the controls (31/50) (90%, 92% vs. 62%;  $p=0.001$ ).

On the other hand, serology results obtained after the completion of the 24-week follow-up allowed for formulating the following conclusions:

- in both group of children with bronchial asthma (AE and CA), the number of patients with positive serology was significantly higher as compared to the controls (95% vs. 87% vs. 74%;  $p=0.02$ ),

- in children with asthma exacerbation (AE), serological determinants of an acute *Ch. pneumoniae* infection were detected more frequently (44% vs. 16% vs. 30%;  $p=0.046$ )

The analysis of serology results indicating *Chlamydia pneumoniae* infections in children with chronic asthma (CA) as compared to the controls demonstrated that among the CA children, a lower number of patients presented with serological indicators of acute infections evoked by the pathogen in comparison to the controls (CA/C: 26% vs. 40%), while the prevalence of chronic infections was comparable in both groups (CA/C: 19% vs. 10%) at the time the children were recruited to the study.

The attempt at evaluating the association between severity of bronchial asthma determined based on the requirements for glucocorticosteroid inhalants and the occurrence of subsequent episodes of disease exacerbation in a child with serological indicators of an acute *Ch. pneumoniae* infection demonstrated such an association. After 24 weeks of follow-up,

patients with moderate and severe chronic asthma demonstrated serological indicators of an acute infection over a longer period than patients with mild chronic asthma (82% vs. 38%,  $p=0.035$ ), what might suggest not only poorer pathogen elimination, but also a strong modulatory effect of the infection on the course of eosinophilic inflammation observed in bronchial asthma. The results of the study allowed for formulating the following conclusions:

- Acute and chronic *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* infections occur significantly more frequently in children with asthma as compared to healthy children from the 7-15 years age group.
- *Chlamydia pneumoniae* infections are a significant factor that exacerbates the course of asthma in children aged 7-15 years.
- A prolonged presence of serological indicators of an acute *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with moderate and severe asthma, as well as with recurrent episodes of disease exacerbation may indicate poor elimination of the pathogen determined by the employed anti-inflammatory therapy.
- In the course of respiratory tract infections by *Chlamydia pneumoniae* in children with asthma, basic tests demonstrate significantly higher absolute eosinophil count in peripheral blood.

## 10. Piśmiennictwo

1. Emeryk A. (red.): *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* w zakażeniach dróg oddechowych i chorobach obturacyjnych płuc. *Med. Prakt.*, 2001, 7-64.
2. Everett K.D.E.: *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.*, 2000, 75, 109-126.
3. Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A.: Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49, suppl. 2, 415-440.
4. Fryden A., Kihlström E., Maller R. et al.: A clinical and epidemiological study of „ornithosis” caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *Scand. J. Infect. Dis.*, 1989, 681-691.
5. Grayston J.T., Campbell L.A., Kuo Ch.-Ch., Mordhorst C.H. et al.: A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. *J. Infect. Dis.*, 1990, 161, 618-625.
6. Grayston J.T., Campbell L.A., Kuo Ch.-Ch., Mordhorst C.H. et al.: A new *Chlamydia psittaci* strain TWAR, isolated in acute respiratory. *N. Engl. J. Med.*, 1987, 335, 32.
7. Hackstadt, T.: Cell biology. In: *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*. Edited by R. S. Stephens. Washington, D.C.: ASM Press., 1999, 101-138.
8. Moulder J.W., Hatch J.P., Kuo C.C., Schachter J.T., Storz J.: Genus *Chlamydia*. w: Krieg N.R., Holt J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984, 729-739.
9. Rockey D.D., Lenart J., Stephens R.S.: Genome sequencing and our understanding of *chlamydiae*. *Infect. Immun.*, 2000, 68, 5473-5479.
10. Aldous M.B., Grayston J.T. et al.: Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1996-1979. *J. Infect. Dis.*, 1992, 166, 646.
11. Bannantine J.P., Griffiths R.S., Viratyosin W., Brown W.J., Rockey D.D.: A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell. Microbiol.*, 2000, 2, 35-47.
12. Bavoil P.M., Hsia R.-Ch., Ojcius D.M.: Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology*, 2000, 146, 2723-2731.

13. Beatty W.L., Morrison R.P., Byrne G.I.: Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, 1994, 58, 686-699.
14. Hackstadt T., Fischer E. R., Scidmore M. A., Rockey D. D., Heinzen R. A.: Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol.*, 1999, 5, 288-293.
15. Komura H., Matsushima H., Ouchi K., Shirai M., Nakazawa T., Furukawa S.: Effects of anti-asthma drugs on the growth of *Chlamydomphila pneumoniae* in Hep-2 cells. *J. Infect. Chemother.*, 2003, 9, 160-4.
16. Rockey D.: Chlamydial cell biology in pictures. The 10th International Chlamydia Symposium on Human Chlamydial Infections, Antalya, Turkey, June 16-21 2002. [www.chlamydiae.com](http://www.chlamydiae.com)
17. Airene S., Surcel H.M., Tuukanen J., Leinonen M. et al.: *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand. J. Immunol.*, 2002, 55, 390-8.
18. Bannantine J.P., Griffiths R.S., Viratyosin W., Brown W.J., Rockey D.D.: A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell. Microbiol.*, 2000, 2, 35-47.
19. Blasi F.: *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infection. W: Saikku P. Proceedings Fourth Meeting of European Society for Chlamydia Research. Universitas Helsingiensis, Helsinki, 2000, 231.
20. Burian K., Hegyesi H., Buzas E., Endresz V. et al.: *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *pneumoniae* induces histidine decarboxylase production in the mouse lung. *Immunol. Lett.*, 2003, 89, 229-36.
21. Campbell L.A., Kuo C.C., Grayston J.T.: Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1990, 58, 93-97.
22. Campbell L.A.: *Chlamydia pneumoniae* pathogenesis. *J. Med. Microbiol.* 1992, 51, 623.
23. Falsey A.R., Walsh E.E.: Transmission of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.*, 1993, 168, 493-6.
24. Fong I.W., Chiu B., Viira E., Fong M.W., Jang D. Mahony J.: Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35, 48-52.
25. Gupta S.: *Chlamydia pneumoniae*, monocyte activation, and azithromycin in coronary hart disease. *Am.Heart J.*, 1999, 139, 539.
26. Halme S., Von Hertzen L., Bloigu A., Karpjos J. et al.: *Chlamydia pneumoniae*-specific cell-mediated and humoral immunity in healthy people. *Scand. J. Immunol.*, 1998, 47, 517-520.



27. Hammerschlag M.R.: Chlamydia pneumoniae and the lung. *Eur. Respir. J.*, 2000, 16, 1001-1007.
28. Hammerschlag M.R.: Current status of laboratory diagnosis of Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci. *Clin. Microbiol. Newslett.*, 2001, 23, 107-115.
29. Huhtinen M., Puolakkainen M., Laasila K., Sarvas M., Karma A., Leirisalo-Repo M., Chlamydial antibodies in patients with previous acute anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, 42, 1816–1819.
30. Huittinen T.: Chlamydia pneumoniae infection, inflammation and shock protein 60 immunity in asthma and coronary heart disease. Academic Dissertation. The Faculty of Medicine of University of Oulu, Oulu, 2003.
31. Ignatius W.F., Chiu B., Viira E., Fong M., Jang D., Mahony J.: Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35, 48-52.
32. Ishida T., Hashimoto T., Machiko A., Ito I. Et al.: Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. *Chest*, 1998, 114, 1588-1593.
33. Jordan I.K., Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V.: Gene conversions in genes encoding outer-membrane proteins in *H. Pylori* and *C. pneumoniae*. *Trends Genet.*, 2001, 17, 7-10.
34. Kaukoranta-Tolvanen S.S., Laitinen K., Saikku P., Leinonen M.: Chlamydia pneumoniae multiplies in human endothelial cells in vitro. *Microb. Pathog.*, 1994, 16, 313–319.
35. Kauppinen M.T., Lahde S., Syrjala H.: Roentgenographic findings of pneumonia caused by Chlamydia pneumoniae: a comparison with Streptococcus pneumonia. *Arch. Intern. Med.*, 1996, 156, 1851-1856.
36. Kinnunen A., Paavonen J., Surcel H.M.: Heat shock protein 60 specific T-cell response in chlamydial infections. *Scand. J. Immunol.*, 2001, 54, 76–81.
37. Kosma P.: Chlamydial lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1455, 387-402.
38. Kuo C.C.: Pathologic manifestation of chlamydial infection. *Am. Heart J.*, 1999, 138, suppl., 496-499.
39. Kuo C.C., Campbell L.A.: Detection of Chlamydia pneumoniae in arterial tissues. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181, Suppl 3, 432–436.
40. Laurila A., Anttila T., Läärä E., Bloigu A., Virtamo J., Albanes D., Leinonen M., Saikku P.: Serological evidence of an association between Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer. *Int. J. Cancer*, 1997, 74, 31–34.

41. Lieberman D., Ben-Yaakov M., Lazarovich Z., Porath A. et al.: Chlamydia pneumoniae community-acquired pneumonia: a review of 62 hospitalized adult patients. *Infection*, 1996, 24, 109-114.
42. Mazur E., Niedźwiadek J., Chmielewska-Badora J.: Przewlekła infekcja Chlamydia pneumoniae u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2000, 68, 261-264.
43. Miyashita N., Yoshihito N., Nakajima M., Fukano H., Matsushima T.: Prevalence of asymptomatic infection with Chlamydia pneumoniae in subjectively healthy adults. *Chest*, 2001, 119, 1416–1419.
44. Moazed T.C., Kuo C.C., Grayston J.T., Campbell L.A.: Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. *J. Infect. Dis.*, 1998, 177, 1322–1325.
45. Morrison R.P., Lyng K., Caldwell H.D.: Chlamydial disease pathogenesis. Ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57-kD protein. *J. Exp. Med.* 1989, 169, 663–675.
46. Montigiani S., Falugi F., Scarselli M., Finco O., Petracca R., Galli G., Mariani M., Manetti R., Agnusdei M., Cevenini R., Donatti M., Nogarotto R., Norais N., Garaguso I., Nuti S., Saletti M., Rosa D., Ratti G., Grandi G.: Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae. *Infect. Immun.*, 2002, 70, 368-379.
47. Multhoff G., Hightower L.E.: Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones*, 1996, 1, 167–176.
48. Nitsch-Osuch A., Choroszy-Król I., Teryks-Wołyniec D.: Zapalenia płuc wywołane przez Chlamydia trachomatis i Chlamydia pneumoniae u dzieci z wrodzonymi wadami serca. *Klin. Chorób Zakaż. Zakaż. Szpit.*, 2000, 4, 9-14.
49. Nitsch-Osuch A., Choroszy-Król I., Wardyn A.K.: Zakażenia wywołane przez Chlamydia pneumoniae. *Wyd. Med. Górnicki, Wrocław*, 2001.
50. Normann E., Gnarpe J., Nääs J., Gnarpe H. et al.: Chlamydia pneumoniae in children undergoing adenoidectomy. *Acta Paediatr.*, 2001, 90, 126-9.
51. Nurminen M., Leinonen M., Saikku P., Mäkelä P.H.: The genus-specific antigen of Chlamydia: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. *Science*, 1983, 220, 1279–1281.
52. Ojcius D.M., Souque P., Perfettini J.-L., Dautry-Varsat A.: Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen Chlamydia psittaci. *J. Immunol.*, 1998, 161, 4220-4226.

53. Perez Melgosa M., Kuo C.C., Campbell L.A.: Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1991, 59, 2195–2199.
54. Podsiadły E.: Badania nad zależnością pomiędzy zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* a występowaniem miażdżycy. Rozprawa doktorska. Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa, 2002.
55. Rocha E.P.C., Pardillon O., Bui H., Sayada Ch., Denamur E.: A new family of highly variable proteins in the *Chlamydia pneumoniae* genome. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 4351-4360.
56. Rockey D., Lenart J., Stephens R.: Genome sequencing and our understanding of *Chlamydiae*. *Infect. Immun.*, 2000, 68, 5472-5479.
57. Saikku P.: Diagnosis of acute and chronic *Chlamydia pneumoniae* infections. Proceedings of the Eight International Symposium on Human Chlamydial Infections: Chlamydial infections. Chateau de Montvillargenne 6027000 Gouvieux-Chantilly, France, June 19-24 1994, 163-172.
58. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH, Huttunen JK & Valtonen V.: Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*, 1985, 2, 983–986.
59. Stawarski A., Iwańczak B., Choroszy-Król I.: Mieszane atypowe zapalenie płuc spowodowane przez *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* u 6-letniego chłopca. *Ped. Pol.*, 1999, 74, 1203-1207.
60. Stephens R.S.: The cellular paradigm of chlamydia pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 2003, 11, 44-48.
61. Tyl J.: Chlamydiowe zakażenia dróg oddechowych u dzieci. *Przegl. Pediatr.*, 2003, 33, 41-45.
62. Wahl C., Maier S., Marre R., Essig A.: *Chlamydia pneumoniae* induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in a human monocytic cell line by an NF-kappaB-dependent pathway. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2003, 293, 377-81.
63. Yang Z.P., Kuo C.C., Grayston J.T.: Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, 736–738.
64. Zügel U., Kaufmann S.: Role of Heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, 19-39.
65. Berdal B.P., Scheel O., Øgaard A.R. et al.: Spread of subclinical *Chlamydia pneumoniae* infection in a closed community. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1992, 24, 431-436.

66. Blasi F., Cosentini R., Denti F., Allegra L.: Two family outbreaks of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur. Respir. J.*, 1994, 7, 102–104.
67. Campbell L.A., Kuo C.C, Wang S., Grayston J.T. : Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 1261-1264.
68. Chirgwin K., Roblin P.M., Gelling M., Hammerschlag M.R.: Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. *J. Infect. Dis.*, 1991, 163, 757-761.
69. Ekman M.R., Grayston J.T., Visakorpi R., Kleemola M., Kuo C.C., Saikku P.: An epidemic of infections due to *Chlamydia pneumoniae* in military conscripts. *Clin. Infect. Dis.*, 1993, 17, 420–425.
70. Grayston J.T., Mordhorst C., Bruu A.L., Vene S., Wang S.P.: Countrywide epidemics of *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, in Scandinavia, 1981-1983. *J. Infect. Dis.*, 1989, 159, 1111–1114.
71. Hahn D.L., Golubjatnikov R.: Smoking is a potential confounder of the *Chlamydia pneumoniae*-coronary artery disease association. *Arterioscler. Thromb.*, 1992, 12, 945–947.
72. Heiskanen-Kosma T., Korppi M., Laurila A. et al.: *Chlamydia pneumoniae* is an important cause of community-acquired pneumonia in school-aged children: serological results of a prospective, population-based study. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1999, 31, 255-259.
73. Karvonen M., Tuomilehto J., Pitkäniemi J., Naukkarinen A., Saikku P.: Importance of smoking for *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Int. J. Epidemiol.*, 1994, 23, 1315–1321.
74. Kauppinen M.T., Herva E., Kujala P., Leinonen M. et al.: The etiology of community-acquired pneumonia among hospitalized patients during a *Chlamydia pneumoniae* epidemic in Finland. *J. Infect. Dis.*, 1995, 172, 1330-5.
75. Laurila A.L., Antila T., Laara E., Bloigu A., Virtamo J., Albanes D., Leinonen M., Saikku P.: Sereological evidence of an association between *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer. *Int. J. Cancer*, 1997, 74, 31-34.
76. Lund-Olsen I., Lundbäck A., Gnarpe J., Gnarpe H.: Prevalence of specific antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory infections. *Acta Paediatr.*, 1994, 83, 1143-5.
77. Marrie T.J., Peeling R.W., Fine M.J. , Singer D.E. et al.: Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. *Am. J. Med.*, 1996, 101, 508-515.
78. Morison M., Surcel H.-M., Laurila A., Lehtinen M., Karttunen R., Juvonen J., Paavonen J., Morrison R.P., Saikku P., Juvonen T. : Detection of *Chlamydia* – re-

- active T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, 20, 1061-1067.
79. Miyashita N., Yoshihito N., Nakajima M., Fukano H., Matsushima T.: Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. *Chest*, 2001, 1416-1420.
80. Normann E., Gnarpe J., Gnarpe H., Wettergren B.: *Chlamydia pneumoniae* in children attending day-care centers in Gävle, Sweden. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1998, 17, 474-8.
81. Normann E., Gnarpe J., Gnarpe H., Wettergren B.: *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections. *Acta Paediatr.*, 1998, 87, 23-7.
82. Saikku P., Wang SP., Kleemola M., Brander E., Rusanen E., Grayston JT.: An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*. *J. Infect. Dis.*, 1985, 151, 832-839.
83. Sobiech E., Karmowski A.: Serologiczne badania w kierunku chlamydiozy u dzieci z zapaleniem górnych dróg oddechowych i płuc w latach 1993-1996 na terenie Wrocławia. *Ginek. Pol.*, 1999, 70, 167-171.
84. Tjhie J.H.T., Wendelien Dorigo-Zetsma J., Roosendaal R., Van Den Brule A.J.C.: *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute respiratory infection in general practices in the Netherlands. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2000, 32, 13-17.
85. Bas S., Muzzin P., Ninet B., Bornard E. et al.: Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39, 1368-1377.
86. Bennedsen M., Berthelsen L., Lind I.: Performance of three microimmunofluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M, G and A antibodies. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2002, 9, 833-39.
87. Black C.M., Fields P.I., Messmer T.O., Berdal B.P.; Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested primers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994, 13, 752-756.
88. Boman J., Allard A., Persson K., Lundborg M., Juto P., Wadell G.: Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J. Infect. Dis.*, 1997, 175, 1523-1526.
89. Boman J., Gaydos Ch., Quinn T. C.: Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J. Infect. Dis.*, 1999, 37, 3791-3799.

90. Carballal G., Mahony J.B., Videla C., Cerqueiro C. et al.: Chlamydial antibodies in children with lower respiratory disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1992, 11, 68-71.
91. Cles L.D., Stamm W.E.: Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 938–940.
92. Dowell S.F., Peeling R.W., Boman J., Carlone G.M. et al.: Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 33, 492-503.
93. Ekman M.R., Leinonen M., Syrjälä H., Linnanmäki E., Kujala P., Saikku P.: Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia during an epidemic in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 1993, 12, 756–760.
94. Freidank H.M., Vogele H., Eckert K.: Evaluation of new commercial immunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997, 16, 685.
95. Grossman D.F.: Zapalenie płuc wywołane przez bakterie atypowe – diagnostyka i leczenie. *Med. Dypl.*, 1999, 8, wyd. specj. sierpień, 7-16.
96. Hermann C., Graf K., Groh A. et al.: Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 1603-1609.
97. von Hertzen L., Surcel H.M., Kaprio J., Koskenvuo M., Bloigu A., Leinonen M. Saikku P.: Immune responses to *Chlamydia pneumoniae* in twins in relation to gender and smoking. *J. Med. Microbiol.*, 1998, 47, 441–446.
98. Karunakaran K.P., Blanchard J. F., Raudonikiene A., Shen C., Murrin A. D., Brunham R.C.: Molecular detection and seroepidemiology of the *Chlamydia pneumoniae* Bacteriophage (PhiCpn1). *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 4010-4014.
99. Kaufmann S.H.: Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today*, 1990, 11, 129–136.
100. Kutlin A., Roblin P.M., Hammerschlag M.R.: Antibody response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children with respiratory illness. *J. Infect. Dis.*, 1998, 177, 720-4.
101. Martinez Tagle M.A., Kogan R., Rojas P., Rubilar L. Et al.: Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* in community-acquired pneumonia in children in Chile. *Acta Paediatr.*, 2000, 89, 650-3.
102. Meijer A., Roholl P. J. M., Gielis-Propser S. K., Meulenberg Y. F., Ossewaarde

- J.M.: *Chlamydia pneumoniae* in vitro and in vivo: a critical evaluation of situ detection methods. *J. Clin. Pathol.*, 2000, 53, 904-910.
103. Miyashita N., Matsumoto A., Kubota Y., Nakajima M., Niki Y., Matsushima T.: Continuous isolation and characterization of *Chlamydia pneumoniae* from a patient with diffuse panbronchiolitis. *Microbiol. Immunol.*, 1996, 40, 547-552.
104. Mosorin M., Surcel H.M., Laurila A., Lehtinen M., Karttunen R., Juvonen J., Paavonen J., Morrison R.P., Saikku P., Juvonen T.: Detection of *Chlamydia pneumoniae*-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, 20, 1061-1067.
105. Persson K., Boman J. : Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections by *Chlamydia pneumoniae*. *Clin and Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, 8, 739-744.
106. Petitjean J., Vincent F., Fretigny M., Vabret A. et al.: Comparison of two serological methods and a polymerase chain reaction-enzyme immunoassay for the diagnosis of acute respiratory infections with *Chlamydia pneumoniae* in adults. *J. Med. Microbiol.*, 1998, 47, 615-621.
107. Roblin P.M., Dumornay W., Hammerschlag M.R.: Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 1968-1971.
108. Stralin K.: Labsystem enzyme immunoassay for *Chlamydia pneumoniae* also detects *Chlamydia psittaci* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39, 3425-3426.
109. Tapia O., Slepenskin A., Sevrioukov E., Hamor K.: Inclusion fluorescent-antibody test as a screening assay for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2002, 9, 562-567.
110. Tuuminen T., Vainionpaa R.: Development of enzyme immunoassays to detect salivary sIgA to *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Scand. J. Lab. Invest.*, 2001, 61, 357-362.
111. Tuuminen T., Varjo S., Ingman H., Weber T. et al.: Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2000, 7, 734-738.
112. Wang S.S.: Detection of *Chlamydia pneumoniae* and other organisms of the *Chlamydiaceae* family by strand displacement amplification on the BD Probe Tec<sup>TM</sup> ET System. Materials from The Clinical Virology Symposium, Clearwater, Florida, 2001.

- 113.Christiansen G., Pedersen A.S., Hjerno K., Vandahl B., Birkelund S.: Potential relevance of *Chlamydia pneumoniae* surface proteins to an effective vaccine. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181, suppl 3, 528–537.
- 114.Cook P.J., Honeybourne D.: *Chlamydia pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1994, 34, 859-873.
- 115.Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy and prevention. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 163, 1730-1754.
- 116.Hahn D.L.: Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection in adult asthma: a before-after trial. *J. Fam. Pract.*, 1995, 41, 345-351.
- 117.Korppi M.:Community-acquired pneumonia in children: issues in optimizing antibacterial treatment. *Paediatr Drugs*, 2003, 5, 821-32.
- 118.Kraft M., Cassell G.H., Pak J., Martin R.J.: *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in asthma: effect of clarithromycin. *Chest*, 2002, 12, 1782-8.
- 119.Labro M.T.: Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, 41, suppl. B, 37-46.
- 120.McCracken G.H.: Etiology and treatment of pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2000, 19, 373-7.
- 121.Miyashita N., Fukano H., Yoshida K., Niki Y., Matsushima T.: In-vitro activity of moxifloxacin and other fluoroquinolones against *Chlamydia* species. *J. Infect, Chemother.*, 2002, 8, 115–117.
- 122.Miyashita N., Fukano H., Niki Y., Matsushima T.: In vitro activity of telithromycin, a new ketolide, against *Chlamydia pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 48, 403–405.
- 123.Muhlestein J.B., Anderson J.L., Carlquist J.F., Salunkhe K., Horne B.D, Pearson R.R., Bunch T.J., Allen A., Trehan S., Nielson C.: Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. *Circulation*, 2000, 102, 1755–1760.
- 124.Roblin P.M., Montalban G., Hammerschlag M.R.: Susceptibilities to clarithromycin and erythromycin of isolates of *Chlamydia pneumoniae* from children with pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, 38, 1588-1589.
- 125.Roblin P.M., Hammerschlag M.R.: In vitro activity of a new ketolide antibiotic, HMR 3647, against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998 42, 1515–1516.



- 126.Svanholm C., Bandholtz L., Castaños-Velez E., Wigzell H. et al.: Protective DNA immunization against *Chlamydia pneumoniae*. *Scand. J. Immunol.*, 2000, 51, 345-353.
- 127.Ulgietseme J., Eko F. O., Black C.M. : Contemporary approaches to designing and evaluating vaccines against *Chlamydia*. *Expert Rev. Vaccines*, 2003, 2, 129-146.
- 128.Welsh L, Gaydos C, Quinn.: In vitro activities of azithromycin, clarithromycin, erythromycin, and tetracycline against 13 strains of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40, 212–214.
- 129.Wubbel L., Muniz L., Ahmed A., Trujillo M. et al.: Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1999, 18, 98-104.
- 130.Barnes P.J., Godfrey S.: *Asthma*. Martin Dunitz, London, 2000,1-89.
- 131.Global strategy for asthma management and prevention. Update 2003 (GINA 2003). NIH Publication No 02-3659. [www.ginaasthma.com/workshop\\_revised.pdf](http://www.ginaasthma.com/workshop_revised.pdf)
- 132.Kurzawa R. (red); Wytuczne postępowania w astmie oskrzelowej u dzieci. *Med. Prakt. Ped.*, wyd. specj. 2000, 2, 2-27.
- 133.National Heart, Lung, and Blood Institute: National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report 2: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. NIH Publication No.97–4051, 1997.
- 134.National Heart, Lung, and Blood Institute: Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. NIH Publication No. 02–3659, 2002.
- 135.National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization: Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. NIH Publication No. 95–3659, 1995.
- 136.Bręborowicz A., Lis G., Cichocka-Jarosz E., et al.: Astma oskrzelowa w populacji dzieci szkolnych – narastający problem zdrowotny w świetle badania ISAAC. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.*, 2003, 9, 39s
- 137.Bukowczan Z., Kurzawa R., Bukowczan J.: Epidemiologia chorób alergicznych. *Klin. Pediatr.*, 2004, 12, 4-7.
- 138.Lis G., Bręborowicz A., Sobkowiak P., Głodzik I., Gazuje D., Światły A., Alkiewicz J.: Wzrost zachorowań na choroby alergiczne w Polsce – wyniki badania ISAAC. *Alergia*, 2003, 3, 16,57.
- 139.Lorenz J.: Epidemiology and clinical aspects of asthma. *Eur. Respir. Rev.*, 1996, 6, 218-223.

140. National Center for Health Statistics. National Health Interview Survey. Asthma Prevalence, Health Care Use and Mortality, 2000-2001. [WWW]. 2003 [Cited 13.3.2003] Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/products/>
141. Pisiewicz K.: Epidemiologia astmy oskrzelowej u dzieci w Polsce. *Terapia*, 2002, 11, 4-7.
142. Ball T.M., Castro-Rodriguez J.A., Griffith K.A., Holberg C.J., Martinez F.D., Wright A.L.: Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N. Engl. J. Med.*, 2000, 343, 538–543.
143. Brouard J., Freymuth F., Toutain F., Bach N. et al.: Role of viral infections and Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infections in asthma in infants and young children. Epidemiologic study of 118 children. *Arch. Pediatr.*, 2002, 9, suppl. 3, 365-371.
144. Drożdż W.: Astma. Zarys patofizjologii, zasady diagnostyki i leczenia. Wyd. Lek.PZWL, Warszawa, 2002, 35-303.
145. Gern J.E.: Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 105, 497–502.
146. Gern J.E., Busse W.W.: The role of viral infections in the natural history of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 106, 201–212.
147. Hahn D.L.: Infectious asthma: a reemerging clinical entity? *J. Fam. Pract.*, 1995, 41, 153–157.
148. Illi S., von Mutius E., Lau S., Bergmann R., Niggemann B., Sommerfeld C., Wahn U.: Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ*, 2001, 322, 390–395.
149. Kulus M.: Wpływ wczesnej interwencji na naturalny przebieg astmy. *Terapia*, 2002, 3, 19-23.
150. Ober C., Moffatt M.: The genetic of asthma. The pathobiology of asthma: Implication for treatment; Ed. S. Wenzel; *Clin.Chest Med.*, 2000, 212, 245.
151. Allegra L., Blasi F., Centanni S., Cosentini R. et al.: Acute exacerbations of asthma in adults: role of Chlamydia pneumoniae infection. *Eur. Respir. J.*, 1994, 7, 2165-2168.
152. Biscione G.L., Xie P., Johnston W.B.R. : Prevalence of Chlamydia pneumoniae (CP) infection in children admitted to hospital with acute respiratory illness using PCR. *Eur. Respir. J.*, 1998, 12, suppl. 12, 148-149.
153. Björnsson E., Hjelman E., Janson Ch. et al.: Serology of Chlamydia in relation to asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1996, 28, 63-69.

154. Black P.N., Scicchitano R., Jenkins C.R., Blasi F. et al.: Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur. Respir. J.*, 2000, 15, 254-259.
155. Bremont F., Micheau P., Le Roux P., Brouard J. et al.: Etiology of chronic cough in children: analysis of 100 cases. *Arch. Pediatr.*, 2001, 8, suppl. 3, 645-649.
156. Cook P.J., Davis P., Tunnicliffe W. et al.: *Chlamydia pneumoniae* and asthma. *Thorax*, 1998, 53, 254-259.
157. Cunningham A.F., Johnston S.L., Julious S.A., Lampe F.C., Ward M.E.: Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. *Eur. Respir. J.*, 1998, 11, 345-349.
158. Emre U., Roblin P.E., Gelling M., Dumornay W. et al.: The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airway disease in children. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 1994, 148, 727-732.
159. Emeryk A.: Zakażenia chlamydialne a astma. *Standardy Medyczne*, 2004, 6, 32-33.
160. Esposito S., Blasi F., Arosio C. et al.: Importance of acute *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children with wheezing. *Eur. Respir. J.*, 2000, 16, 1142-1146.
161. Fryden A., Kihlstrom E., Maller R.: A clinical and epidemiological study of ornithosis caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1989, 21, 681-686.
162. Gencay M., Roth M.: *Chlamydia pneumoniae* infections in asthma: clinical implication. *Am J Respir Med.*, 2003, 2, 31-38.
163. Gern J.E.: Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 105, 497-502.
164. Hahn D.L., Dodge R.W., Golubjatnikov R.: Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA*, 1991, 266, 225-230.
165. Hahn D.L., Golubjatnikov R.: Asthma and chlamydial infection: a case series. *J. Fam. Pract.*, 1994, 38, 589-595.
166. Hahn D.L.: Intracellular pathogens and their role in asthma: *Chlamydia pneumoniae* in adult patients. *Eur. Respir. Rev.*, 1996, 6, 224-230.
167. Hahn D.L., Anttila T., Saikku P.: Association of *Chlamydia pneumoniae* IgA antibodies with recently symptomatic asthma. *Epidemiol. Infect.*, 1996, 117, 513-517.
168. Hahn D.L., Bukstein D., Luskin A.: Evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection in steroid dependent asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1998, 80, 45-49.

- 169.Hahn D.L., McDonald R.: Can acute Chlamydia pneumoniae respiratory tract infection initiate chronic asthma? *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1998, 81, 339–344.
- 170.Hahn D.L.: Chlamydia pneumoniae, asthma, and COPD: what is the evidence? *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1999, 83, 271–288, 291.
- 171.Hahn D.L., Peeling R.W., Dillon E., McDonald R., Saikku P.: Serologic markers for Chlamydia pneumoniae in asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2000, 84, 227–233.
- 172.Hallander H.O., Gnarpe J., Gnarpe H., Olin P.: Bordetella parapertussis, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae and persistent cough in children. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1999, 31, 281-286.
- 173.Isaacks D., Joshi P.: Respiratory infections and asthma. *Med. J. Aust.*, 2002, 177, suppl., 50-1.
- 174.Jebrak G., Brugiere O., Uffredi M.L.: Impact des infections a Chlamydia pneumoniae sur la maladie asthmatique. *Presse Med.*, 2000, 29, 1425-31.
- 175.Johnston S.L, Martin R.J.: Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae: a role in asthma pathogenesis? *Am. J Respir Crit Care Med*, 2005.
- 176.Kocabas E., Altintas d., Kibar F. : The role of Chlamydia pneumoniae in acute exacerbation of asthma due to infection. *Eur. Respir. J* 1997, 10, suppl. 25, 340.
- 177.Kraft M.: The role of bacterial infections in asthma. *Clin. Chest Med.*, 2000, 21, 301–313.
- 178.Krenke R.: Rola zakażeń układu oddechowego w rozwoju remodelingu dróg oddechowych. *Terapia*, 2002, 3, 3-10.
- 179.Larsen F.O., Norn S., Mordhorst C.H., Stahl Skov P. et al.: Chlamydia pneumoniae and possible relationship to asthma: serum immunoglobulins and histamine release in patients and controls. *APMIS*, 1998, 106, 928-934.
- 180.Lieberman D., Lieberman D., Printz S., Ben-Yaakov M. et al.: Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, 167, 406-10.
- 181.Martin R.J., Kraft M., Chu H.W.: A link between chronic asthma and chronic infection. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001,107, 595-601.
- 182.Miyashita N., Kubota Y., Nakajima M., Niki Y.: Chlamydia pneumoniae and exacerbations of asthma in adults. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1998, 80, 405-9.
- 183.Montalbano M.M., Lemanske R.F. Jr.: Infections and asthma in children. *Curr Opin Pediatr.*, 2002, 14, 334-7.

184. Nagy A., Kozma G.T., 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, 729-43.
185. Niedźwiadek J., Mazur E., Chmielewska-Badora, Gryglicka B. i in.: Przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae* u chorych na astmę oskrzelową. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2000, 68, 255-260.
186. Shemer-Avni Y., Lieberman D.: *Chlamydia pneumoniae*-induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, 1274–1278.
187. Schmidt S.M., Muller C.E., Bruns R., Wiersbitzky S.K.W.: Bronchial *Chlamydia pneumoniae* infection, markers of allergic inflammation and lung function in children. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2001, 12, 257-65.
188. Shwarze J., Gelfand E.W.: The role of viruses in development of exacerbation of atopic asthma. *Clin. Chest Med.*, 2000, 21, 279-87.
189. Sutherland E.R., Brandorff J. M., Martin R. J.: Atypical bacterial pneumonia and asthma risk. *J Asthma*, 2004, 41, 863-868.
190. Thumerelle C., Deschildre A., Bouquillon C., Santos C. Et al.: Role of viruses and atypical bacteria in exacerbations of asthma in hospitalized children: a prospective study in the Nord-Pas de Calais region (France). *Pediatr. Pulmonol.*, 2003, 35, 75-82.
191. Grzelewska –Rzymowska I., Kroczyńska – Bednarek J.: Nadreaktywność oskrzeli i nieswoiste testy prowokacji odoskrzelowej w diagnostyce astmy. *Terapia*, 2004, 11, 16-22.
192. Jędrzyś-Kłucjasz U., Kurzawa R.: Astma oskrzelowa u dzieci-diagnostyka i leczenie. *Terapia*, 2004, 11, 7-15.
193. Pierzchała W.: Badania czynnościowe układu oddechowego w zaostrzeniu astmy i POCHP. *Terapia*, 2002, 3, 1218.
194. Skoner D.P.: Outcome measures in childhood asthma. *Pediatrics*, 2002, 109, 393-398.
195. Wark PA, Gibson PG, Johnston SL.: Exacerbations of asthma: addressing the triggers and treatments. *Monaldi Arch. Chest Dis.*, 2001, 56, 429–435.
196. Pfaller M.A.: Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: Practicality and costs. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, 7, 312-318.
197. Peeling R.W., Wang S.P., Grayston J.T., Blasi F., Boman J., Clad A., Freidank H., Gaydos C.A., Gnarp J., Hagiwara T., Jones R.B., Orfila J., Persson K., Puolakainen M., Saikku P., Schachter J.: *Chlamydia pneumoniae* serology: interlabora-

- tory variation in microimmunofluorescence assay results. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181, suppl. 3, 426–429.
198. Tuuminen T., Palomäki P., Paavonen J.: The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J. Microbiol. Methods*, 2000, 42, 265-279.
199. Wang S.-P.: The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: technique and interpretation. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181, suppl.3, 421-5.

**11. Spis tabel.**

	strona
1. Charakterystyka cech biologicznych Chlamydii.....	6
2. Objawy i rozpoznania towarzyszące zakażeniu <i>Ch. pneumoniae</i> u dzieci.....	13
3. Przyczyny świszczącego oddechu u dzieci w zależności od wieku.....	26
4. Porównanie wybranych cech demograficznych w badanych grupach.....	40
5. Porównanie wybranych cech klinicznych w grupach chorych z astmą oskrzelową .....	40
6. Nasilenie objawów astmy oskrzelowej w okresie 7 dni przed rozpoczęciem bada- nia.....	41
7. Dawki przyjmowanych glikokortykosteroidów wziewnych w grupie dzieci z za- ostrzeniem objawów astmy i w grupie przewlekłej astmy.....	42
8. Średnie wartości leukocytozy i bezwzględnej liczby eozynofili w grupach bada- nych i kontrolnej.....	43
9. Wyniki oznaczenia klasy swoistych przeciwciał IgE przeciwko roztoczom kurzu domowego w grupach chorych z astmą.....	44
10. Wyniki oznaczenia całkowitego stężenia IgE przeciwko roztoczom kurzu domowe- go w grupach chorych z astmą.....	44
11. Charakterystyka zaostrzeń astmy w trakcie 24 tygodniowej obserwacji wśród dzieci z grupy badanej.....	45
12. Wyniki badań serologicznych w kierunku zakażenia <i>Chlamydia pneumoniae</i> w chwili kwalifikacji do badania w grupie dzieci z przewlekłą AO (PAO) i w grupie kontrolnej.....	45
13. Liczba dzieci prezentujących serologiczne cechy ostrego lub przewlekłego zakaże- nia <i>Ch. pneumoniae</i> w grupie pacjentów z przewlekłą astmą (PAO) w porównaniu do grupy kontrolnej.....	46
14. Wyniki badań serologicznych po 3 i 6 tygodniach od kwalifikacji do badania w grupie dzieci zakwalifikowanych do grupy zaostrzenie AO w porównaniu do grupy kontrolnej.....	47

15. Liczba dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) w porównaniu do grupy kontrolnej.....48
16. Wyniki badań serologicznych w 3 i 6 tygodniu od rozpoznania zaostrzenia objawów astmy grupie wszystkich dzieci z AO i z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia choroby w porównaniu do grupy kontrolnej.....49
17. Liczba dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażenia *Ch. pneumoniae* w grupie dzieci z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia objawów astmy w trakcie 24 tygodniowej obserwacji w porównaniu do grupy kontrolnej..... 50
18. Zmiana obserwowanych wyników serologicznych po 24 tygodniowej obserwacji w grupach badanych i kontrolnej.....51
19. Porównanie wybranych czynników klinicznych w grupie dzieci z astmą i rozpoznaniem w trakcie obserwacji klinicznej ostrym i przewlekłym zakażeniem *Ch. pneumoniae* oraz dzieci z brakiem serologicznych cech zakażenia ..... 53
20. Ocena związku pomiędzy stopniem ciężkości astmy i występowaniem co najmniej jednego zaostrzenia choroby u chorego dziecka z cechami serologicznymi ostrego zakażenia *Ch. pneumoniae* w trakcie 24 tygodniowej obserwacji .....54
21. Ocena wpływu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w grupie badanej dzieci z astmą na przyrost wartości FEV1 w teście bronchodilatacyjnym.....54
22. Ocena wpływu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w grupie badanej dzieci z astmą na zmienność dobową PEF.....55
23. Wzór dzienniczka obserwacji pacjenta stosowany do monitorowania przebiegu astmy u pacjenta z grupy badanej.....88
24. Wzór indywidualnej karty obserwacji pacjenta w grupie z zaostrzeniem objawów choroby (strona 1 i 2).....89
25. Wzór indywidualnej karty obserwacji pacjenta w grupie bez zaostrzenia objawów choroby (strona 1 i 2).....91
26. Wzór indywidualnej karty obserwacji pacjenta w grupie kontrolnej.....93



## 12. Spis rycin

	strona
1. Ciałko podstawowe <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	7
2. Ciałka elementarne (EB) <i>Chlamydia pneumoniae</i> atakujące komórkę gospodarza i po przekształceniu zakaźnego EB w aktywne metabolicznie ciałko siateczkowe (RB).....	8
3. Cykl rozwojowy chlamydii.....	9
4. Możliwe zależności pomiędzy zakażeniem wirusowym, astmą i alergizacją.....	23
5. Pacjenci z ostrym zakażeniem układu oddechowego wywołanym przez <i>Ch. pneumoniae</i> – dynamika narastania przeciwciał w klasach IgM i IgG.....	33
6. Schemat pobierania materiału do badań serologicznych.....	35
7. Dawki wziewnych glikokortykosteroidów w poszczególnych grupach badanych .....	42
8. Wartości leukocytozy w poszczególnych grupach badanych w dniu kwalifikacji do badania (dane przedstawiono jako mediana oraz 25-75 percentyl).....	43
9. Wartości bezwzględne eozynofili (AEC) w poszczególnych grupach badanych w dniu kwalifikacji do badania (dane przedstawiono jako mediana oraz 25-75 percentyl).....	43
10. Odsetek dzieci prezentujących serologiczne cechy ostrego lub przewlekłego zakażenia <i>Ch. pneumoniae</i> w grupie pacjentów z przewlekłą astmą oskrzelową (PA-O) w porównaniu do grupy kontrolnej.....	46
11. Wyniki badań serologicznych po 3 i 6 tygodniach od kwalifikacji do badania dzieci z zaostrzeniem astmy oskrzelowej (ZAO) w porównaniu do grupy kontrolnej.....	47
12. Odsetek dzieci z serologicznymi cechami ostrego i przewlekłego zakażeniem <i>Ch. pneumoniae</i> w grupie dzieci z zaostrzeniem objawów astmy (ZAO) w porównaniu do grupy kontrolnej.....	48
13. Wyniki badań serologicznych po 3 i 6 tygodniach od rozpoznania zaostrzenia astmy w grupie wszystkich dzieci z astmą i u dzieci z grupy kontrolnej.....	49
14. Odsetek dzieci z ostrym i przewlekłym zakażeniem <i>Ch. pneumoniae</i> w grupie dzieci z rozpoznaniem co najmniej jednym epizodem zaostrzenia objawów astmy	

oskrzelowej w trakcie 24 tygodniowej obserwacji w porównaniu do grupy kontrolnej.....	50
15. Wyniki badań serologicznych w grupach badanych i kontrolnej po 24 tygodniowej obserwacji.....	51
16. Wyniki serologiczne w grupach badanych i kontrolnej po 24 tygodniowej obserwacji.....	52

## 13. Aneks

Tabela 23. Wzór dzienniczka obserwacji pacjenta stosowany do monitorowania przebiegu astmy u pacjenta z grupy badanej

<i>Dzienniczek obserwacji pacjenta :</i>						
				Rok :	Miesiąc:	Strona dzienniczka:
Nazwisko :			Imię :		NR. Ks. Głównej :	
Data urodzenia :	Wzrost :		PEF nal :		<b>PEF alarmujący (!) :</b>	

(!) natychmiast zgłosić się do kontroli

Dzień miesiąca	Obserwacje RANO			Obserwacje WIECZOREM			$\Delta$ PEF	Dawka GKS <sub>w</sub>
	Objawy (0-4)	PEF*	Ilość ** inhalacji $\beta$ -mimetyku	Objawy (0-4)	PEF*	Ilość ** inhalacji $\beta$ -mimetyku		
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								

Zmienność PEF:  $\Delta$ PEF = (PEF max – PEF min) x 100 % / (PEF max + PEF min) x 0,5

\* Zanotuj najlepszy z 3 pomiarów

\*\* Ilość inhalacji -mimetyku w ciągu ostatnich 24 godzin

**Tabela 24. Wzór indywidualnej karty obserwacji pacjenta w grupie z zastrzeniem objawów choroby (strona 1 i 2)**

<i>Indywidualna</i>			<b>GRUPA</b>	<b>ZAO</b>
<b>KARTA OBSERWACJI PACJENTA</b>				
Nazwisko :		Imię :		NR. Ks. Głównej :
Data urodzenia :	Płeć :	Wzrost :	Waga :	
Imię i nazwisko Opiekuna :		Adres korespondencyjny :		Telefon kontaktowy :

**Jednostka** Klinika Chorób Dzieci Katedry Pediatrii  
**prowadząca badanie :** Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**Temat badania :** Rola zakażeń Chlamydia pneumoniae  
w wywoływaniu zastrzeżeń astmy oskrzelowej u dzieci

**Lekarz prowadzący :** Lek. med. Beata Dolik

--

### I. Wizyta kwalifikacyjna.

1. Wyrażona pisemna zgoda warunkująca udział dziecka w badaniu:

--

2. Czas trwania choroby :

1	2	3	4	5
< 6 miesięcy	> 6 m-cy < 1 roku	> 1 roku < 5 lat	> 5 lat < 10 lat	> 10 lat < 15 lat

3. Liczba zastrzeżeń choroby :

W ciągu ostatnich 12 miesięcy	Wymagająca doustnych KS	Wymagających hospitalizacji

4. Aktualna dawka sterydów wziewnych i doustnych (na 24 h)

I	II	III	IV
50-200µg *	200-500µg	500-800 µg	800-1000 µg**

\*Lub Cromogenu

Lp.	**W tym preparat	dawka
1.	Encorton	
2.	Solu-Medrol	

5. Występowanie atopii w rodzinie (Ilość osób bezpośrednio spokrewnionych):

--

	Pacjent	Matka	Ojciec	Rodzeństwo 1	Rodzeństwo 2
Dodatnie SPT (roztocze)					
Poziom IgE > 120 IU/ml					
Astma oskrzelowa					
Wyprysk atopowy					
Alergiczny nieżyt nosa					



**Tabela 25. Wzór indywidualnej karty obserwacji pacjenta w grupie bez zaostrzenia objawów choroby (strona 1 i 2)**

<b>Indywidualna</b>	<b>GRUPA</b>	<b>PAO</b>
<b>KARTA OBSERWACJI PACJENTA</b>		

Nazwisko :		Imię :		NR. Ks. Głównej :	
Data urodzenia :	Płeć :	Wzrost :		Waga :	
Imię i nazwisko Opiekuna :		Adres korespondencyjny :		Telefon kontaktowy :	

**Jednostka** Klinika Chorób Dzieci Katedry Pediatrii  
**prowadząca badanie :** Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**Temat badania :** Rola zakażeń Chlamydia pneumoniae  
w wywoływaniu zaostrzeń astmy oskrzelowej u dzieci

**Lekarz prowadzący :** Lek. med. Beata Dolik

### I. Wizyta kwalifikacyjna.

1. Wyrażona pisemna zgoda warunkująca udział dziecka w badaniu:

2. Czas trwania choroby :

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
< 6 miesięcy	> 6 m-cy < 1 roku	> 1 roku < 5 lat	> 5 lat < 10 lat	> 10 lat < 15 lat

3. Liczba zaostrzeń choroby :

W ciągu ostatnich 12 miesięcy	Wymagająca doustnych KS	Wymagających hospitalizacji

4. Aktualna dawka sterydów wziewnych i doustnych (na 24 h)

<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
50-200µg *	200-500µg	500-800 µg	800-1000 µg**

\*Lub Cromogenu

Lp.	**W tym preparat	dawka
1.	Encorton	
2.	Solu-Medron	

5. Występowanie atopii w rodzinie (Ilość osób bezpośrednio spokrewnionych):

	Pacjent	Matka	Ojciec	Rodzeństwo 1	Rodzeństwo 2
Dodatknie SPT (roztocze)					
Poziom IgE > 120 IU/ml					
Astma oskrzelowa					
Wyprysk atopowy					
Alergiczny nieżyt nosa					



