

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIO-MEDICHE  
DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE IN  
DISCIPLINE MICROBIOLOGICHE  
XXV CICLO

---

---

**DOTT.SSA ADRIANA TIRALONGO**

**RUOLO DELL'INFEZIONE DA *CHLAMYDOPHILA*  
*PNEUMONIAE* IN PAZIENTI AFFETTI DA ASMA  
GRAVE**

—————  
**Tesi di Dottorato**  
—————

Coordinatore:  
Prof.ssa Adriana Garozzo

Tutor: Prof. Aldo Stivala  
Tutor: Dott. Massimo Caruso

---

---

TRIENNIO 2009 – 2012

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 4</b>
<b><i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE</i></b>	<b>7</b>
CLAMIDIA: GENERALITA'	7
TASSONOMIA	9
CICLO DI SVILUPPO	13
GENETICA DEL MICRORGANISMO	17
STRUTTURA ANTIGENICA	19
IMMUNOPATOGENESI	21
EPIDEMIOLOGIA	23
DIAGNOSI	25
TERAPIA	26
<b>L'ASMA</b>	<b>27</b>
<b><i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE</i> NELL'ASMA</b>	<b>34</b>
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>41</b>
ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI	41
RACCOLTA DEI CAMPIONI	44
METODO COLTURALE	47

IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA	49
SAGGIO DI MICROIMMUNOFLUORESCENZA	50
DIAGNOSTICA MOLECOLARE	54
ESTRAZIONE DEL DNA	54
REAL TIME PCR	55
<b>RISULTATI</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>77</b>

## INTRODUZIONE

La *Chlamydia pneumoniae* infetta le cellule epiteliali del tratto respiratorio causando faringiti, bronchiti, e polmoniti acquisite<sup>[1,2]</sup>; occasionalmente è anche responsabile di otiti, meningoencefaliti ed endocarditi. Recenti studi hanno definito la *C.pneumoniae* come il più comune patogeno intracellulare non virale, e la sua persistenza nei monociti può essere implicata nella genesi di patologie croniche, quali l'asma dell'adulto<sup>[3,4]</sup>, la lesione aterosclerotica<sup>[5,6]</sup>, la malattia di Alzheimer<sup>[7,8,9]</sup> e la Sclerosi Multipla<sup>[10,11,12]</sup>. L'associazione dell'infezione di *C.pneumoniae* con l'asma è controversa.

L'asma è la patologia allergica per eccellenza. E' una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree caratterizzata da una aumentata suscettibilità bronchiale a stimoli esterni, nella quale svolgono un ruolo di primo piano numerose cellule, in particolare i mastociti, gli eosinofili e i linfociti T. Si presenta con difficoltà respiratoria, accessi di tosse secca, fischi e sibili respiratori, affanno e scadimento delle condizioni generali. I fattori scatenanti dell'asma non sono del tutto chiari, incide una componente genetica e l'esposizione in ambienti con particelle

irritanti. Le infezioni respiratorie possono avere un ruolo importante sia nella comparsa dell'asma che nello scatenare la riacutizzazione in molti pazienti<sup>[13]</sup>.

Le indagini epidemiologiche hanno dimostrato un'aumentata prevalenza di sintomi asmatici nei soggetti con pregresse e frequenti infezioni respiratorie che contribuiscono al potenziamento della risposta infiammatoria bronchiale<sup>[4]</sup>.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità, stima che al mondo soffrano di asma circa trecento milioni di persone, il problema è pertanto molto sentito negli ambienti sanitari: ed è per questo che è nato il progetto di ricerca U-BIOPRED della durata di cinque anni, finanziato dalla Commissione Europea e dalla EFPIA (European Federation of the Pharmaceutical Industries Association). Per la realizzazione di questo progetto è stato istituito il consorzio U-BIOPRED, composto da venti centri universitari europei, tra cui per l'Italia l'Università Cattolica del Sacro Cuore e l'Università di Catania, dieci industrie farmaceutiche, sei organizzazioni di pazienti, tra cui LIAF-Onlus Lega Italiana Antifumo, tre piccole-medie imprese e una multinazionale non farmaceutica, che è risultato vincitore del bando Innovative Medicines Initiative (IMI) 2008,

dal titolo la “Comprensione dell’asma grave” (Understanding severe asthma).

Tale progetto prevede il reclutamento e lo studio di pazienti con asma grave da fenotipizzare clinicamente con l'obiettivo di individuare nuove terapie: non tutti i tipi di asma infatti sono gli stessi, mentre le cure spesso adottano un approccio uniforme, che non sempre funziona in modo ottimale<sup>[14]</sup>. L’obiettivo finale è quello di giungere a diagnosi e terapie sempre più personalizzate e scoprire cure adeguate per l’asma grave, una patologia attualmente poco controllabile.

## ***CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE***

### **CLAMIDIA: GENERALITÀ**

Il termine *Chlamydia* deriva dal greco *chlamys*, che richiama il significato di copertura “a mantello” e si riferisce alla modalità di inclusione nel citoplasma della cellula da parte del microrganismo, che ricopre il nucleo della cellula infettata. Le clamidie sono parassiti intracellulari obbligati immobili delle cellule eucariotiche. Vennero isolate per la prima volta nei primi anni '60; in passato, la loro filtrabilità, la difficoltà a individuarli al microscopio ottico e la loro capacità di moltiplicarsi all'interno del citoplasma delle cellule ospiti, li fece classificare come virus; in seguito furono considerati come forme intermedie tra i virus e le rickettsie. F.M. Burnet nel 1960 propose il termine *Magnovirus*, poi prevalse il nome *Bedsonia*, in onore del microbiologo inglese T. Bedson (1886-1969), e infine quello attuale di *Chlamydiae* attribuito dal Comitato per la tassonomia dell'American Society for Microbiology, che ha definitivamente classificato questi

microrganismi tra i batteri per la duplice composizione degli acidi nucleici (DNA e RNA)<sup>[15]</sup>.

Le clamidie costituiscono un gruppo di microrganismi coccoidi gram-negativi, che non crescono nei terreni di coltura e richiedono cellule viventi per moltiplicarsi.

Differiscono dai virus perché:

- possiedono ambedue gli acidi nucleici (DNA e RNA);
- hanno una parete cellulare di composizione simile a quella dei batteri gram-negativi ma priva dello strato di peptidoglicano;
- possiedono un certo numero di enzimi glicolitici;
- si moltiplicano per scissione binaria;
- sono sensibili alle tetracicline (a molti antibiotici a largo spettro).

Da molti Autori le clamidie sono state anche considerate come enterobatteri, adattati al parassitismo intracellulare. Per le caratteristiche sopra esposte, del tutto simili a quelle delle rickettsie, in passato sono state classificate, appunto, come rickettsie. Tuttavia, oggi esse vengono considerate un gruppo a sé stante per alcune peculiari caratteristiche che le contraddistinguono e le accomunano:

- hanno una morfologia simile (sferoidale);

- presentano un antigene gruppo-specifico comune, di natura polisaccaridica;
- si moltiplicano nel citoplasma delle cellule ospiti attraverso un ciclo di sviluppo caratteristico, con la formazione di particolari inclusioni intracellulari citoplasmatiche che possono o no contenere glicogeno; la specie *Chlamydia trachomatis* ha inclusioni contenenti glicogeno mentre la *Chlamydophila pneumoniae* e la *Chlamydophila psittaci* ne sono prive. Le inclusioni intracellulari sono costituite da microcolonie inglobate in un vacuolo delimitato da una membrana derivata dalla cellula ospite; queste inclusioni, che possono essere osservate al microscopio ottico, si dispongono attorno al nucleo della cellula<sup>[16]</sup>.

## TASSONOMIA

La classificazione iniziale dell'ordine delle *Chlamydiales* (con un'unica famiglia *Chlamydiaceae* ed un unico genere *Chlamydia* comprendente le quattro specie *C.trachomatis*, *C.pneumoniae*, *C.psittaci*, *C.pecorum*) fu basata soprattutto ponendo in evidenza il differente quadro clinico

provocato e considerando le diverse categorie di soggetti colpiti. Recentemente<sup>[17]</sup>, l'introduzione dei dati dell'analisi filogenetica degli RNA ribosomali 16S e 23S negli studi di tassonomia ha portato notevoli rimaneggiamenti nell'ordine delle *Chlamydiales* con il riconoscimento di quattro gruppi distinti di clamidie, inquadrati a livello di famiglia. La famiglia delle *Chlamydiaceae* è stata suddivisa in due generi distinti: *Chlamydia* e *Chlamydophila*. Le specie all'interno di questa famiglia presentano un'omologia maggiore del 90% tra le sequenze dei geni per gli RNA ribosomali 16S. Inoltre tutti i ceppi compresi nella famiglia delle *Chlamydiaceae* sono riconosciuti da anticorpi monoclonali che riconoscono l'LPS, che rappresenta l'antigene genere-specifico.

Altre tre famiglie, create per inquadrare tassonomicamente i nuovi batteri "Chlamydia-like" scoperti recentemente, sono rappresentate dalla famiglia *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Simkaniaceae*. I batteri appartenenti a queste famiglie sono a parassitismo intracellulare obbligato con un ciclo di sviluppo simile a quello delle Clamidie e hanno un'omologia superiore all'80% per le sequenze dei geni per gli RNA ribosomali 16S di *Chlamydia*.

Nel genere *Chlamydia*, vengono identificata tre specie: *C.trachomatis*, *C.muridarum* e *C.suis*; caratteristiche comuni al genere sono la presenza

di glicogeno colorabile con il liquido di Lugol nelle inclusioni citoplasmatiche, un genoma di circa 1.0-1.1 Mbp, presenza nella maggior parte dei ceppi di plasmidi extracromosomici e una sensibilità variabile alla sulfodiazina. Solo la specie *C.trachomatis* è rilevante per l'uomo dal punto di vista patologico. Questa specie comprende 18 sierotipi raggruppati in due biotipi: tracoma e linfogranuloma venereo (LGV)<sup>[18,19]</sup>, a circolazione esclusivamente interumana. Il biotipo tracoma possiede 14 sierotipi designati con le lettere da A a K più Ba, Da, Ia. I sierotipi A, B, Ba e C causano il tracoma e le congiuntiviti da inclusione, mentre quelli da D a K sono causa di infezioni oculo-genitali. Il biotipo LGV consiste di quattro sierotipi: L1, L2, L2a, L3, sessualmente trasmessi e in grado di invadere il tessuto linfatico.

Nel genere *Chlamydophila*, vengono identificate tre specie: *C.pecorum*, *C.psittaci*, *C.pneumoniae*. In questo genere il genoma è approssimativamente 1.2 Mbp, non viene prodotto glicogeno nelle inclusioni, ha una sensibilità variabile alla sulfodiazina e plasmidi extracromosomici sono presenti esclusivamente in *C.psittaci*. Questa specie provoca la psittacosi ed è trasmissibile all'uomo solo occasionalmente mentre la *C.pneumoniae* è rilevante per l'uomo dal punto di vista patologico.

Le differenti specie di clamidia hanno un accentuato tropismo per diversi tipi cellulari, *C.trachomatis* invade l'epitelio mucoso e i fagociti mononucleati; *C.pneumoniae* è capace di moltiplicarsi in monociti, macrofagi, cellule dell'endotelio vascolare, cellule muscolari lisce<sup>[20, 21]</sup>. È stato dimostrato che essa induce la trasformazione dei macrofagi in cellule vischiose, prodromo dell'ateroma<sup>[20, 22]</sup>. Da ciò deriva un facile accesso alla circolazione sistemica, con diffusione dei componenti cellulari batterici in siti corporei distanti. La presenza in circolo di anticorpi faciliterà altresì la formazione di immunocomplessi, capaci di mantenere persistenti le reazioni infiammatorie<sup>[21]</sup>.

Il primo ceppo di *C.pneumoniae*, siglato TW-183 (TW=Taiwan), fu isolato nel 1965 da un tampone congiuntivale di un bambina di Taiwan; il primo isolamento faringeo, siglato AR-39 (AR=*acute respiratory*), fu ottenuta nel 1983 a Seattle, nella Stato di Washington. Dalla sigla di questi due ceppi, unendo, le lettere iniziali, è stata ricavata la denominazione TWAR. Inizialmente questi microrganismi furono attribuiti alla specie *Chlamydia psittaci.*, successivamente *C.pneumoniae* è stata definitivamente riconosciuta come una nuova specie in grado di provocare una malattia a carico dell'apparato respiratorio<sup>[16, 23]</sup>.

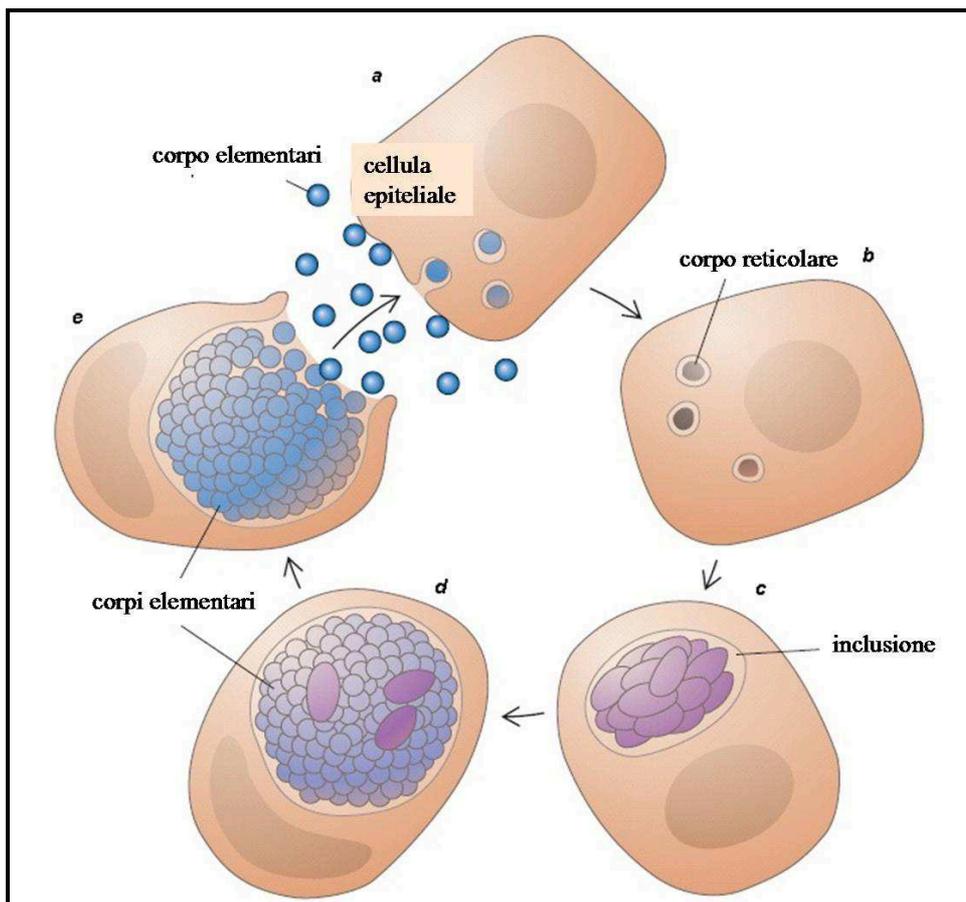
Attualmente sono state isolate poche decine di ceppi di questa specie, quasi tutti da pazienti con malattie respiratorie acute. Nonostante il relativamente basso numero di isolamenti, ricerche sierologiche hanno, dimostrato la notevole diffusione di questa specie. È diventata quindi evidente che *Chlamydophila pneumoniae* è un patogeno respiratorio emergente che sostiene soprattutto polmoniti (sia endemiche che epidemiche) principalmente nei bambini più piccoli, ma anche molto più raramente bronchiti, faringiti, sinusiti e sindromi febbrili simil-influenzali. È stato stimato che circa il 10% delle polmoniti acquisite in comunità siano, dovute a *C.pneumoniae*. Finora si conosce un solo sierotipo di questa specie e i ceppi più diffusi sono TW-183, AR-39 e CM-1<sup>[16]</sup>.

## **CICLO DI SVILUPPO**

Il ciclo di sviluppo delle clamidie è dimorfico, caratterizzato dall'alternanza tra un corpo elementare di piccole dimensioni e infettante, ed un corpo reticolare, di maggiori dimensioni. I corpi elementari presentano un aspetto piriforme nella specie *Chlamydophila pneumoniae*, rotondeggiante nella *C.psittaci* e *Chlamydia trachomatis*,

del diametro di 0,3  $\mu\text{m}$  circa e costituiscono la forma extracellulare che sopravvive all'ambiente esterno. L'adesione alla cellula ospite richiede il legame delle MOMP a specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule dell'epitelio mucoso. I corpi elementari penetrano nella cellula attraverso un meccanismo di fagocitosi specifica indotta ed inibiscono la fusione del fagosoma con i lisosomi cellulari impedendo la lisi intracellulare. Nel citoplasma la durata del ciclo riproduttivo richiede circa 48 ore. Dopo 6-8 ore dall'entrata nella cellula la maggior parte dei corpi elementari si idratano, si accrescono e si trasformano all'interno del fagosoma in forme metabolicamente attive, i corpi reticolari, non infettanti, ricchi di RNA reticolare, con diametro fino a circa 1 $\mu\text{m}$ , che si dividono per scissione binaria. Il fagosoma in cui si accumulano viene detto inclusione ed è visibile al microscopio ottico. In questa fase il parassita interferisce maggiormente con la cellula ospite: i corpi reticolari sintetizzano DNA, RNA e proteine ma utilizzano l'ATP della cellula. L'attività metabolica raggiunge il massimo fra le 18 e le 24 ore, dopo di che i corpi reticolari attraversano un processo di riorganizzazione e di condensazione per dare nuovamente origine ai corpi elementari, all'interno dell'inclusione citoplasmatica. Al termine del ciclo, dopo 48 ore circa, questi elementi infettanti si liberano

nell'ambiente circostante per lisi della cellula ospitante, ormai definitivamente danneggiata o per esocitosi, lasciando la cellula ospite intatta<sup>[16, 24]</sup>. La figura 1 rappresenta schematicamente il ciclo di sviluppo.



**Figura 1** Schema del ciclo riproduttivo della clamidia. I corpi elementari penetrano nella cellula attraverso un meccanismo di fagocitosi specifica (a). Dopo 6-8 ore la maggior parte dei corpi elementari si trasformano nei corpi reticolari, che si dividono per scissione binaria (b). Il fagosoma in cui si accumulano viene detto inclusione (c). L'attività metabolica raggiunge il massimo fra le 18 e le 24 ore, dopo di che i corpi reticolari si trasformano nuovamente in corpi elementari, all'interno dell'inclusione citoplasmatica (d). Al termine del ciclo, dopo 48 ore circa, avviene la liberazione dei corpi elementari per lisi della cellula ospitante, o per esocitosi (e).

La capacità di causare un'infezione persistente nell'organismo ospite è una delle caratteristiche più importanti di tutte le specie di clamidie. La persistenza è caratterizzata dal fatto che l'ospite non riesce ad eliminare il microrganismo che, una volta riattivato, potrà riprendere il suo normale ciclo di sviluppo. Da un punto di vista clinico la clamidia è in grado di persistere nell'ospite per mesi o anni, spesso senza provocare una malattia evidente. L'infezione persistente da *Chlamydia trachomatis* è stata ben descritta, mentre quella causata da *C.pneumoniae* è meno caratterizzata, ma è stato visto essere implicata nella patogenesi di diverse malattie croniche nell'uomo quali ad esempio l'asma, l'artrite, e l'aterosclerosi. Una migliore comprensione dei meccanismi di persistenza della clamidia possono aiutare a rilevare queste infezioni e portare allo sviluppo di una terapia efficace<sup>[25]</sup>. E' stato visto che la clamidia può entrare in uno stato persistente dopo trattamento con alcune citochine, come l'interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), il trattamento con alcuni antibiotici (ad es. la penicillina) e la riduzione o l'assenza di alcuni fattori nutritivi come il glucosio<sup>[26, 27]</sup>. L'IFN- $\gamma$  comporta l'induzione dell'indolamina-2-3-diossigenasi, la quale provoca la degradazione del triptofano, essenziale per la crescita della cellula batterica. Conseguenza

di ciò sarà la generazione di forme aberranti ed un'infezione cronica persistente<sup>[28]</sup>.

Mentre l'organismo è in stato persistente, l'attività metabolica è ridotta, e l'organismo è spesso refrattario al trattamento con antibiotici; i corpi reticolari smettono di dividersi, non si differenziano in corpi elementari e presentano una morfologia differente trasformandosi in corpi aberranti.

*In vitro* la clamidia può rimanere nello stato persistente fino a un mese mantenendo la vitalità. La rimozione dei fattori di stress consente il recupero della forma infettiva<sup>[29]</sup>.

## **GENETICA DEL MICRORGANISMO**

I corpi elementari e reticolari contengono sia DNA che RNA che si trovano in quantità quattro volte maggiori nei corpi reticolari rispetto ai corpi elementari. Nei corpi elementari la maggior parte del DNA è concentrata nel nucleoide centrale elettrone-denso. Il genoma circolare delle clamidie (P.M.  $7 \times 10^8$ ) è uno dei più piccoli genomi procariotici, è simile a quello dei cromosomi batterici ed è stato interamente sequenziato nell'ambito del Chlamydia Genome Project<sup>[30]</sup>. Il contenuto in G+ C è del 40%.

Il sequenziamento del genoma delle clamidie ha fornito un valido strumento per il loro reinquadramento tassonomico, in base ai livelli di analogia dei geni codificanti per l'RNA ribosomiale 16S, rispettivamente non inferiori a 95,90 e 80%.

Il genoma di *C.pneumoniae* è stato sequenziato completamente nel 1999 e contiene  $1.23 \times 10^6$  nucleotidi e circa 1052 geni codificanti per proteine<sup>[31]</sup> e non contiene elementi extracromosomici come il genoma plasmidico, individuato invece nella specie *C.trachomatis*<sup>[32]</sup>.

Il genoma di *C.pneumoniae* è strutturalmente simile a quello di *C.trachomatis* e *C.psittaci*; l'analisi delle sequenze ha mostrato che i geni della *C.pneumoniae* sono sostanzialmente simili ai geni che codificano per le proteine strutturali, funzionali ed immunologicamente attive delle specie *C.trachomatis* e *C.psittaci*. Tra questi risultano omologhi i geni ompA, ompB, groEL e DnaK. La sequenza del gene MOMP (OmpA) è stata analizzata ed è risultata essere identica a quella delle altre due specie.

Il gene ompB codifica per una proteina putativa di membrana esterna (proteine ricche di cisteina di 60-kDa) che risulta essere altamente conservata nelle altre specie di clamidia.

I due geni (*groEL* e *DnaK*), codificanti due heat shock proteins (rispettivamente HSP-60 e HSP-70) coinvolte nell'immunopatogenesi da infezione di *C.trachomatis*, sono stati isolati anche da *C.pneumoniae*, mostrando un'omologia di sequenza.

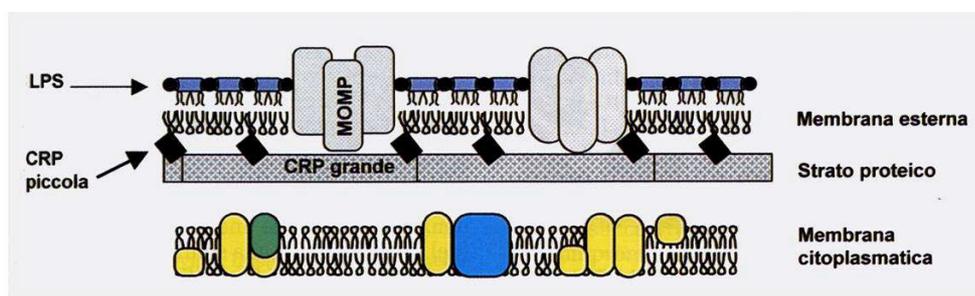
E' stato tuttavia isolato anche un gene di *C.pneumoniae* che codifica per una proteina di 76-kDa dalle proprietà antigeniche specifiche<sup>[16, 33]</sup>.

## **STRUTTURA ANTIGENICA**

La struttura antigenica delle clamidie è caratterizzata dalla presenza di un antigene di gruppo (genere-specifico), di antigeni specie-specifici e tipo-specifici. L'antigene di gruppo è rappresentato dal lipopolisaccaride (LPS) della parete cellulare; esso ha ridotta tossicità a differenza dell'LPS dei batteri gram-negativi. Gli anticorpi attivi contro questi antigeni genere-specifici possono essere messi in evidenza mediante la reazione di fissazione del complemento e la immunofluorescenza. La risposta anticorpale all'LPS è rapida e rilevante nelle infezioni acute da *C.pneumoniae* e *C.psittaci*; meno intensa quella generata da *C.trachomatis*.

Gli antigeni specie-specifici o (sierotipo) serovar-specifici sono in gran parte rappresentati dalle proteine della membrana esterna (OMP), di cui la MOMP (proteina maggiore della membrana esterna, codificata dal gene *omp1*) ricopre in quantità oltre la metà, con il probabile significato funzionale di porina. Gli antigeni specifici possono essere evidenziati mediante immunofluorescenza, soprattutto con l'uso di anticorpi monoclonali<sup>[30, 34]</sup>.

La figura 2 illustra lo schema della probabile organizzazione degli involucri esterni della clamidia.



**Figura 2** Schema della probabile organizzazione degli involucri esterni di clamidia. LPS= Lipopolisaccaride (endotossina); MOMP=major outer membrane protein; CRP=cysteine-rich protein

Il quadro degli antigeni proteici è molto complesso e studi dettagliati hanno rivelato risposte anticorpali difformi in relazione ai gruppi di popolazione studiati, alla diffusione epidemiologica dei ceppi batterici, nonché alla variabilità antigenica in differenti sierotipi<sup>[21]</sup>.

Nelle infezioni da *C.pneumoniae* la proteina MOMP appare nel complesso meno reattiva e c'è incertezza sui componenti cellulari che conferiscono la specie-specificità; alcuni studi suggeriscono un ruolo per la proteina 65 kDa; altre ricerche illustrano una forte risposta alla proteina 98 kDa; altri ancora hanno messo in evidenza una risposta immune rivolta alla proteina 54 kDa.

## **IMMUNOPATOGENESI**

La risposta anticorpale più precoce avviene verso la tipica componente lipopolisaccaridica (LPS) della parete cellulare clamidiale. Le proteine della membrana esterna (OMP) rivestono un ruolo immunogeno, in particolare il gruppo proteico MOMP (major outer membrane protein), quantitativamente il più rilevante, è altamente immunogeno nelle infezioni da *C.trachomatis*, ma molto meno nelle infezioni da *C.pneumoniae*. La proteina MOMP contiene epitopi specie-specifici, oltre a domini cross-reattivi, condivisi dalle altre specie clamidiali.

L'importanza della risposta immune cellulo-mediata è da porre in relazione al parassitismo intracellulare di *Chlamydia*, evidenziandosi sia negli aspetti di protezione biologica dell'ospite che in quelli distruttivi

del germe. Essa viene coinvolta nelle infezioni insieme alla risposta anticorpale, ma il suo ruolo è predominante. Le cellule CD4+ sono attivate nell'infezione primaria producendo citochine attivanti altri linfociti; le CD8+ distruggono le cellule-target infette. Il meccanismo infiammatorio protratto conduce verso uno stato di ipersensibilità ritardata, responsabile degli eventi successivi. Un ruolo importante è rivestito in tale contesto dalla cosiddetta heat shock protein (hsp60) clamidiale attraverso un mimetismo antigenico con la hsp60 umana, verso la quale si attiva una reazione autoimmune. Pari rilevanza è assunta dalle citochine: l'IFN- $\gamma$  delle cellule infettate è attivato per contrastare la replicazione di *Chlamydia*. In *vitro* è stato riscontrato che la persistenza dell'attivazione dell'IFN- $\gamma$  comporta l'induzione dell'indolamina-2-3-diossigenasi, la quale provoca degradazione del triptofano, essenziale per la crescita della cellula batterica. Conseguenza di ciò sarà la generazione di forme aberranti ed una infezione cronica persistente<sup>[34]</sup>.

## EPIDEMIOLOGIA

*C.pneumoniae* è un patogeno ubiquitario essendo coinvolto anche in patologie extrapolmonari<sup>[35]</sup>.

Attualmente è ritenuto responsabile di circa il 10% dei casi di polmonite acquisita in comunità (CAP) e il 5% delle faringiti, bronchiti e sinusiti. I sintomi clinici sono simili a quelli indotti dagli altri patogeni respiratori, solo più marcati e curabili con terapia antibiotica. Sebbene secondo alcuni studi la polmonite da clamidia tra i bambini <5 anni sia rara, essa arriva a rappresentare il 6-9% dei casi di polmonite in altri. Diversi autori hanno recentemente evidenziato una correlazione tra infezione di *C.pneumoniae* e asma, così come con le broncopneumopatie croniche ostruttive, con l'otite media e le tonsilliti. Altri studi sieroepidemiologici hanno indicato la correlazione con l'aterosclerosi e quindi, in prospettiva, con l'insufficienza coronaria e con l'infarto del miocardio. L'infezione da *C.pneumoniae* è stata anche associata con diverse patologie neurodegenerative del sistema nervoso centrale, quali alcuni tipi di meningoencefalite, la malattia di Alzheimer e la sclerosi multipla<sup>[35]</sup>.

E' importante sottolineare che non è stata ancora dimostrata una correlazione causale diretta tra il patogeno e queste malattie. La

trasmissione avviene da persona a persona tramite secrezioni respiratorie. La maggior parte dei pazienti ha tosse, febbre e produzione di escreato. Le infezioni sono frequenti nella popolazione generale a tutte le età e possono presentarsi in forma endemica o epidemica; spesso sono asintomatiche o associate ad un quadro clinico lieve. In modo particolare sono a rischio i bambini in età scolastica. Anche le reinfezioni sembrano essere frequenti. Non sono state osservate variazioni stagionali nella frequenza.

Studi di sieroprevalenza mostrano come l'infezione sia mondialmente molto frequente, infatti il 40-50% degli adulti sono portatori di anticorpi anti-*C.pneumoniae*. Nei bambini più piccoli sono pochi ad avere anticorpi, ma verso l'età di 6-8 anni, la prevalenza di questi aumenta durante la prima infanzia<sup>[30]</sup>.

## DIAGNOSI

Esiste una mancanza di standardizzazione dei test diagnostici. E' possibile identificare la *C.pneumoniae* mediante:

- isolamento in colture di cellule in vitro;
- immunofluorescenza diretta;
- ricerca di antigeni specifici mediante reazioni immunoenzimatiche;
- ricerca del DNA del batterio mediante PCR.

Alcuni di questi test non sono solitamente disponibili nella maggior parte dei laboratori clinici. La messa in evidenza del microrganismo tramite coltura è difficile e richiede lunghi tempi di lavorazione e non viene utilizzata a scopi diagnostici. La diagnosi sierologica è basata sulla messa in evidenza di un aumento significativo degli anticorpi fra due sieri prelevati durante la fase acuta e quella di convalescenza. Nell'infezione da *Chlamydia trachomatis* la ricerca di anticorpi non ha valore diagnostico mentre nell'infezione da *C.pneumoniae* e *C.psittaci* la sierodiagnosi invece ha valore diagnostico<sup>[36]</sup>.

Attualmente in diagnostica l'identificazione delle infezioni da clamidie è diventata più accurata grazie alle tecniche di amplificazione genica come

la PCR, che permette di individuare l'appartenenza anche di piccole tracce di materiale nucleare specifico.

La diagnosi va sospettata in un paziente che presenta sintomi tipici, che non ha una diagnosi alternativa confermata e che non risponde agli antibiotici  $\beta$ -lattamici.

## **TERAPIA**

La terapia è rappresentata da tetracicline, macrolidi e alcuni fluorochinoloni. La terapia, proseguita per 2 settimane, può ridurre le recrudescenze. La risposta al trattamento è più lenta rispetto alla polmonite da micoplasma e i sintomi tendono a recidivare se la terapia è interrotta troppo presto. I giovani adulti solitamente hanno un decorso favorevole, ma la mortalità negli anziani è del 5-10%<sup>[37, 38]</sup>.

## L'ASMA

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree caratterizzata da una aumentata suscettibilità bronchiale a stimoli esterni, nella quale svolgono un ruolo di primo piano numerose cellule, in particolare i mastociti, gli eosinofili e i linfociti T. Si presenta con difficoltà respiratoria, accessi di tosse secca, fischi e sibili respiratori, affanno e scadimento delle condizioni generali.

Durante la normale respirazione, l'aria entra ed esce liberamente dai polmoni ma quando l'asma non è sotto controllo, le vie aeree si infiammano e diventano eccessivamente sensibili ai cambiamenti ambientali che possono scatenare facilmente un attacco d'asma. Durante l'attacco, la mucosa delle vie aeree si gonfia, i muscoli intorno alle vie aeree si contraggono ed il muco blocca le vie aeree più piccole nei polmoni, rendendo difficoltosa la respirazione. Nei soggetti asmatici il numero di cellule infiammatorie nelle vie aeree risulta aumentato.

I fattori scatenanti dell'asma non sono del tutto chiari, incide una componente genetica e l'esposizione ad ambienti con particelle irritanti: l'asma si verifica quando un soggetto predisposto a sviluppare la malattia viene in contatto con fattori irritanti o con le sostanze a cui è

divenuto allergico. I fattori che predispongono l'individuo a questa patologia sono la predisposizione genetica (che spiega la maggior frequenza di asma in caso di familiarità per la malattia), la presenza di allergie, il sesso femminile, l'etnia e l'obesità. Può essere distinta in due forme principali: asma atopica nella quale si evidenzia una causa, che quasi sempre è uno o più allergeni (ad es. la polvere, peli di animali, pollini, muffe, fumo di tabacco) e asma non atopica nella quale la causa è spesso sconosciuta e di solito le crisi asmatiche possono essere scatenate da infezioni respiratorie, sostanze irritanti, situazioni emotive, stress ed esercizi fisici estremi. Il fumo, attivo e passivo, rappresenta un fattore di rischio che può portare all'insorgenza dell'asma; è stato visto infatti che il fumo aumenta il rischio di asma nei soggetti con rinite<sup>[39]</sup>. Il fumo determina una maggiore gravità dell'asma e una minore risposta alla terapia farmacologica.

L'atopia determina una iperproduzione di immunoglobuline E (IgE) dirette contro i comuni allergeni ambientali, come i pollini di fiori e piante, le spore dei funghi, gli acari della polvere, i peli degli animali, le muffe e alcune proteine animali. In seguito all'esposizione ad allergeni, gli anticorpi già sensibilizzati danno il via alla risposta infiammatoria.

L'atopia è uno dei principali fattori di rischio noti per lo sviluppo di asma bronchiale e di altre forme allergiche.

Le infezioni respiratorie possono avere un ruolo importante sia nella comparsa dell'asma che nello scatenare la riacutizzazione in molti pazienti.

L'asma colpisce i bambini e gli adulti e può insorgere a qualunque età, rappresenta la più frequente malattia cronica dell'infanzia e sono sempre più frequenti le diagnosi in età adulta e nell'anziano.

Si parla di esacerbazione quando i sintomi di una malattia si fanno più frequenti e più intensi del normale. L'asma esacerbata si manifesta con un aumento della dispnea (mancanza di fiato), tosse e oppressione al torace. La malattia può esacerbarsi quando si viene a diretto contatto con gli allergeni, ma la maggior parte delle esacerbazioni è causata da infezioni.

Le infezioni possono provocare uno sviluppo molto rapido di gravi sintomi asmatici. In questo caso si parla di esacerbazione "acuta" e la cura del caso deve essere somministrata tempestivamente.

Ci sono vari farmaci che possono essere utilizzati nel trattamento dell'asma, come broncodilatatori, corticosteroidi inalatori o associazioni dei due principi attivi. I farmaci broncodilatatori a breve durata di azione

sono somministrati per via inalatoria al fine di dilatare le vie aeree e alleviare i sintomi rappresentati da respiro sibilante e dispnea. I corticosteroidi inalatori sono somministrati per controllare l'infiammazione delle vie aeree, generalmente come regolare terapia quotidiana. Nei casi più gravi di asma la somministrazione di broncodilatatori ad azione più prolungata in combinazione con corticosteroidi può fornire un controllo più efficace.

Anche se dall'asma non si può guarire la malattia può essere controllata efficacemente. La ricerca dimostra che con il trattamento adeguato quasi tutti i pazienti possono realizzare e mantenere un buon controllo dei sintomi: frequentare normalmente la scuola, il lavoro, svolgere attività sportiva ed avere un normale stile di vita<sup>[40]</sup>. L'infiammazione delle vie aeree è una delle caratteristiche più importanti dell'asma in quanto è responsabile delle riacutizzazioni e delle alterazioni della struttura delle vie aeree (rimodellamento) che sono alla base della persistenza dei sintomi nel tempo, della limitazione variabile del flusso aereo e della iperreattività bronchiale, caratteristiche della malattia. Come indicato nelle raccomandazioni delle linee guida GINA (Global Initiative For Asthma), è quindi necessario individuare appropriati test non invasivi da applicare nella ricerca e nella pratica clinica, per la diagnosi, il

monitoraggio e il trattamento della flogosi delle vie aeree, come ad esempio l'esame dell'espettorato prodotto spontaneamente o indotto dopo nebulizzazione con soluzione salina ipertonica. Si tratta di un esame relativamente poco invasivo che consente di campionare direttamente le porzioni cellulare e fluida delle secrezioni delle basse vie aeree con risultati riproducibili e ben correlati con lo stato di attività della malattia<sup>[41]</sup>.

L'asma grave rappresenta almeno il 5-10% degli asmatici e la sua diagnosi necessita di una valutazione più approfondita<sup>[42]</sup>. I fattori da tenere in considerazione sono:

- fattori di aggravamento,
- comorbilità,
- aderenza alla terapia,
- controllo della malattia nel tempo,
- diagnosi alternative all'asma.

L'asma grave è stata definita nei seguenti documenti:

- ERS (European Respiratory Society) Task Force 1999<sup>[43]</sup>,
- ATS (American Thoracic Society) Workshop 2000<sup>[44]</sup>,
- ENFUMOSA (European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma ) 2003<sup>[45]</sup>,

- Paris Workshop 2007 per adulti<sup>[46]</sup>,
- PSACI 2008 per bambini<sup>[47]</sup>,
- WHO document 2010<sup>[48]</sup>,
- U-BIOPRED 2010<sup>[49]</sup>.

Sulla base di questi documenti la definizione condivisa di asma grave risulta la seguente:

“asma non controllata che può determinare rischio di frequenti gravi riacutizzazioni (o morte) e/o effetti collaterali a farmaci e/o cronica morbilità (inclusi non normale funzione polmonare o ridotta crescita polmonare nei bambini)”<sup>[50]</sup>.

Secondo criteri condivisi l’asma grave include 3 gruppi<sup>[50]</sup>:

1. ASMA GRAVE NON IN TRATTAMENTO: in cui l’aggiunta di trattamento anche modesto può ottenere un buon controllo dei sintomi;
2. ASMA GRAVE DIFFICILE DA TRATTARE: in cui fattori associati (aderenza al trattamento in senso lato, fattori di aggravamento, comorbilità, scarso accesso a risorse sanitarie) hanno ruolo essenziale
3. ASMA GRAVE RESISTENTE AL TRATTAMENTO: ASMA REFRATTARIA E ASMA CORTICOSTEROIDE-RESISTENTE: asma parzialmente o poco controllata nonostante trattamento terapeutico.

Nonostante gli incoraggianti sviluppi nella gestione dell'asma, in questo piccolo sottogruppo di pazienti i sintomi persistono malgrado il trattamento aggressivo con alte dosi di ICS (corticosteroidi inalatori) e  $\beta_2$ -agonisti. In questi pazienti il controllo dei sintomi è spesso raggiunto mediante l'uso regolare di corticosteroidi sistemici che causano numerosi effetti collaterali. Tali farmaci dovrebbero essere inseriti per ultimi nelle scelte terapeutiche, e possibilmente limitarne l'uso a brevi periodi e abbinarli a immunoterapia specifica<sup>[51,52]</sup>.

In generale, il raggiungimento ed il mantenimento del buon controllo dell'asma porta alla riduzione del rischio di riacutizzazioni. La prevenzione delle riacutizzazioni è un obiettivo prioritario, specie nei pazienti più gravi, poiché queste possono condizionare la qualità di vita e il decorso dell'asma.

## ***CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* NELL'ASMA**

L'asma è una malattia cronica infiammatoria delle vie aeree in cui diversi fattori, sia genetici che ambientali, contribuiscono all'espressione del fenotipo. Fino al 1970, molti medici hanno considerato l'infezione come un fattore scatenante per l'asma, ma questa convinzione è stata successivamente sostituita dalla premessa che l'asma è una malattia non infettiva la cui causa principale è l'infiammazione. L'interesse per il potenziale ruolo dell'infezione nell'asma riemerge durante il 1990, quando è stata dimostrata l'importanza di infezioni virali come fattori scatenanti della maggior parte delle riacutizzazioni asmatiche.

Il ruolo delle infezioni batteriche nella patogenesi dell'asma è controverso e riguarda principalmente i batteri atipici patogeni delle vie respiratorie, quali *Chlamydophila* (precedentemente *Chlamydia*) *pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*<sup>[4]</sup>. L'eziologia dell'asma coinvolge interazioni tra suscettibilità genetica, esposizione agli allergeni e fattori aggravanti esterni come l'inquinamento dell'aria, il fumo e le infezioni respiratorie. Negli ultimi anni prove cliniche e sperimentali hanno dimostrato che le infezioni respiratorie hanno un ruolo importante

nello sviluppo dei sintomi dell'asma nei soggetti adulti e nei bambini<sup>[53,54,55]</sup>.

Le infezioni di origine virale sono state associate a più dell'80% delle esacerbazioni dell'asma nei bambini in età scolare<sup>[56]</sup>. Le infezioni di batteri atipici, come *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*, possono essere associate all'insorgenza dell'asma o alla sua esacerbazione<sup>[57]</sup> e potrebbero essere coinvolte nell'asma cronica. Studi *in vitro* e *in vivo* evidenziano il ruolo di questi agenti nella patogenesi dell'asma<sup>[58]</sup>. *C.pneumoniae* è l'agente eziologico infettivo di malattie respiratorie come la rinite, faringite, otite, bronchite e polmonite atipica. In alcuni studi sia le prove sierologiche che quelle colturali hanno dimostrato l'associazione di *C.pneumoniae* con l'asma<sup>[3,59]</sup>.

Il primo caso di associazione tra infezione da *C.pneumoniae* e insorgenza dell'asma nell'adulto è stato descritto da Hann et al. nel 1991<sup>[59]</sup>. Evidenze a favore di questa associazione vengono anche da studi che rilevano come alcuni soggetti infetti, trattati con farmaci anticlamidiali, hanno riportato miglioramenti nei sintomi asmatici<sup>[60,61]</sup>. Recentemente, *C.pneumoniae* è stato trovato nel 23% degli episodi di asma nei bambini e la coinfezione con altri patogeni è stata rilevata nel 70% della popolazione oggetto di studio<sup>[62]</sup>. La rilevanza di

*C.pneumoniae* nella patogenesi dell'asma cronica è stata ampiamente studiata. Le numerose evidenze provenienti da studi sierologico-epidemiologici hanno dimostrato che molti asmatici hanno livelli elevati di anticorpi anti-*C.pneumoniae*<sup>[63]</sup>. Tuttavia, è importante notare che le prove di un'associazione tra l'infezione di batteri atipici e l'asma non dimostrano un ruolo diretto causa-effetto nella patogenesi dell'asma, bensì potrebbero indicare una maggiore suscettibilità alle infezioni che determina una maggiore frequenza di rilevamento. L'ipotesi più probabile è che la maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie nei soggetti asmatici porta ad un aumento delle infezioni da parte di batteri atipici, che svolgono un ruolo diretto nell'incremento dell'infiammazione delle vie aeree, contribuendo direttamente alla patogenesi dell'asma<sup>[4,64]</sup>. Nonostante queste evidenze clinico-epidemiologiche, gli eventi patogenetici alla base dell'associazione tra infezioni respiratorie ed esacerbazione dell'asma non sono del tutto chiare<sup>[13]</sup>.

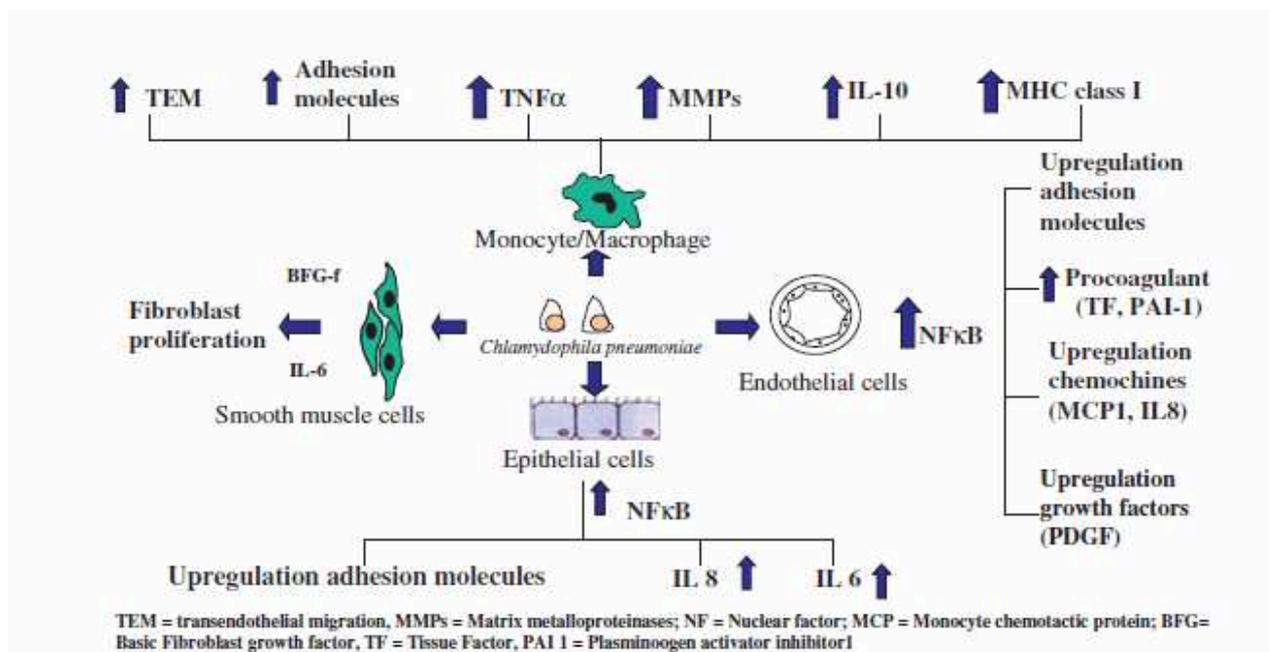
Inoltre l'indagine sulla potenziale associazione tra *C.pneumoniae* e l'asma è fortemente ostacolata dalla mancanza di metodi standardizzati, sensibili e specifici per la rilevazione di questo agente patogeno respiratorio atipico. Un ulteriore ostacolo è rappresentato dalla difficoltà (sia in termini pratici che etici) nel campionamento del tratto respiratorio

inferiore nelle popolazioni rappresentative di pazienti con asma e soggetti di controllo<sup>[4]</sup>.

Sono state avanzate diverse ipotesi sui meccanismi biologici alla base del coinvolgimento di *C.pneumoniae* nella patogenesi dell'asma e nell'infiammazione cronica delle vie aeree<sup>[58,65]</sup>.

Le attuali evidenze indicano che il prodotto di alcuni geni di *C.pneumoniae* (principalmente l'heat shock protein HSP-60), attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione (in particolare il fattore nucleare kappa-B), sono responsabili dell'attivazione di diversi tipi cellulari del tessuto bronchiale (epitelio, endotelio, monociti-macrofagi, cellule muscolari lisce), risultante in una cascata che determina il rilascio di citochine e l'up-regulation delle molecole di adesione, che favoriscono l'infezione persistente e il rimodellamento delle vie aeree<sup>[66,35]</sup>.

La figura 3 riassume le interazioni tra *C.pneumoniae* e i diversi tipi cellulari presenti nelle vie aeree.



**Figura 3** Interazione di *Chlamydia pneumoniae* con diversi tipi di cellule umane. BFG, fattore di crescita dei fibroblasti, IL, interleuchina, MCP, proteina chemiotattica per i monociti; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità, MMP, metalloproteinasi della matrice, NF $\kappa$ B, fattore nucleare kappa-B, PAI-1, inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno, PDGF, fattore di crescita derivato dalle piastrine, TEM, migrazione transendoteliale; TF, fattore tissutale, TNF $\alpha$ , fattore di necrosi tumorale- $\alpha$ . (da Blasi et al Review ,2009)

## SCOPO DELLO STUDIO

Le infezioni atipiche possono essere asintomatiche e possono cronicizzare; alcuni ricercatori le associano con l'insorgenza della malattia coronarica, dell'aterosclerosi, della vasculite, dell'ipertensione o dell'asma. Nonostante numerosi studi, tuttavia, nessuna delle ipotesi proposte è stata dimostrata. D'altra parte, è ampiamente accettato il fatto che le infezioni respiratorie possano influenzare malattie croniche già esistenti, quali ad esempio l'asma. Il ruolo delle infezioni atipiche nella riacutizzazione dell'asma acuta è già stato descritto<sup>[54,67,68]</sup>; mentre non è nota l'influenza di questi patogeni nel controllo dell'asma grave a lungo termine<sup>[64]</sup>.

Lo scopo della ricerca è stato quello di investigare la presenza di *Chlamydophila pneumoniae* in pazienti affetti da asma grave, valutandone l'eventuale ruolo nel controllo dell'asma e della sua severità in soggetti adulti al fine di valutare anche l'utilità di un trattamento terapeutico specifico.

Ad oggi non è stata ancora possibile la standardizzazione di un test diagnostico che risulti accurato e affidabile nell'identificazione di *C.pneumoniae* e ciò rende difficoltoso indagare il ruolo di questo

patogeno nelle malattie croniche. In questo studio sono state utilizzate le tecniche colturali, sierologiche e molecolari per la rilevazione e l'identificazione del patogeno al fine di valutare anche la sensibilità e la specificità di questi test per la diagnosi in questo tipo di patologia.

## **MATERIALI E METODI**

### **ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI**

Attualmente, essendo lo studio U-Biopred ancora in corso, sono stati arruolati 40 volontari adulti sottoposti ad un percorso medico-diagnostico che prevede numerose visite ed esami: anamnesi completa, spirometria, analisi del sangue, analisi delle urine, analisi del respiro mediante naso elettronico, analisi dell'espettorato indotto, tac torace, misurazione del monossido di azoto e del monossido di carbonio nell'aria espirata, test psicologici legati alla condizione asmatica per la valutazione della qualità di vita. Durante queste visite è stato valutato il loro stato di salute, l'eventuale presenza di allergie, la funzione polmonare e il livello di infiammazione. Tutte queste analisi mirano alla completa caratterizzazione dei pazienti, e si associano ad analisi più avanzate, quali genomica, metabolomica, lipidomica e respiromica, mirate all'identificazione di nuovi biomarcatori in grado di predire l'efficacia terapeutica, per realizzare validi modelli pre-clinici individuando nuove molecole in grado di ridurre i sintomi legati alle

forme refrattarie di asma. Il reclutamento dei pazienti è stato condotto presso il reparto di Medicina Interna e d'Urgenza dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Policlinico-Vittorio Emanuele" di Catania nell'ambito del progetto di ricerca U-BIOPRED, coordinato dal Prof. Riccardo Polosa, che prevede lo studio di pazienti con asma grave da fenotipizzare clinicamente con l'obiettivo di individuare nuovi biomarkers: non tutti i tipi di asma infatti sono gli stessi, mentre le cure spesso adottano un approccio uniforme, che non sempre funziona in modo ottimale. Durante questa fase ho collaborato alle attività del gruppo U-BIOPRED, coordinato dal Dott. Massimo Caruso, partecipando alle attività di induzione e processamento dello sputo, applicando il protocollo operativo comune appreso durante il workshop tenutosi al *Southampton General Hospital* di Southampton (United Kingdom), al quale ho partecipato.

Ottenuto il consenso informato allo studio e al trattamento dei dati personali, i pazienti sono stati sottoposti ad uno screening spirometrico iniziale e al prick-test per allergeni comuni per valutare lo stato atopico e successivamente è stata eseguita l'induzione dello sputo ed un prelievo di sangue venoso periferico.

Mediante il prick-test sono stati testati i seguenti allergeni standard:

- *Dermatophagoides pteronyssinus*
- *Dermatophagoides farinae*
- mix graminacee
- mix alberi
- cane
- gatto
- aspergillus

e i seguenti allergeni regionali:

- ambrosia
- alternaria
- olivo.

Per verificare l'eventuale iperproduzione di immunoglobuline E (IgE), spesso associata allo stato atopico, che danno il via alla risposta infiammatoria, è stato effettuato il dosaggio delle IgE specifiche sieriche. Cinque dei 40 pazienti arruolati si sono ritirati dallo studio subito dopo il reclutamento. Il gruppo dei 35 pazienti che hanno partecipato allo studio comprende 23 donne e 12 uomini, di età compresa tra i 20 e i 69 anni, suddivisi in quattro coorti:

- coorte A: pazienti con asma grave (23/35; 65,7%);

- coorte B: pazienti con asma grave, fumatori o ex-fumatori con almeno 1 pack/years (2/35; 5,7%);
- coorte C: pazienti con asma moderata o lieve (5/35; 14,3%)
- coorte D: controlli sani (5/35; 14,3%).

I pazienti con asma moderata o lieve e i soggetti sani (coorte C e D) rappresentano il gruppo di controllo (28,6%), i pazienti delle coorti A e B rappresentano il gruppo degli asmatici (71,4%).

La diagnosi di asma grave o lieve si è basata sulle linee guida GINA (Global Initiative for Asthma)<sup>[69]</sup>.

## **RACCOLTA DEI CAMPIONI**

Durante il reclutamento e le visite dei pazienti ho raccolto dei campioni di cellule provenienti dal processamento dello sputo ottenuto per induzione sui quali ho eseguito i test per l'individuazione della *C.pneumoniae* ed un prelievo di sangue venoso periferico per la ricerca nel siero di anticorpi specifici anti-*C.pneumoniae*.

La tecnica d'induzione prevede l'inalazione di soluzione salina ipertonica (3-4,5%) per un periodo di tempo variabile fino ad un massimo di venti minuti. L'utilizzo di un nebulizzatore ad alto

rendimento e la provocazione della “tosse efficace” permettono di ottenere una quantità maggiore di campione. La pulizia del naso e della bocca prima della procedura riduce la contaminazione del campione. Dal momento che l’inalazione di soluzione salina ipertonica potrebbe provocare broncocostrizione, è necessario monitorare il PEF (picco di flusso espiratorio) con il Peak flow all’inizio e nel corso della procedura. A differenza della spirometria, per la quale è necessaria una espirazione forzata di almeno 6 secondi nell'adulto, la misurazione del PEF richiede, dopo l’inspirazione massima, una espirazione velocissima e massima. Il PEF esprime infatti il flusso nei primi 100-150 msec. dello sforzo espiratorio. Nel caso in cui si registri una caduta del PEF superiore al 20% del valore iniziale registrato è necessario interrompere il processo di induzione. Inoltre, in via precauzionale, prima di iniziare vengono somministrati al paziente  $\beta_2$ -agonisti (200 $\mu$ g di salbutamolo). Nei casi di asma severa è necessario iniziare l’induzione all’espettorazione con soluzione salina normale e, se ben tollerata, aumentare gradualmente la concentrazione (3-4,5%). Il campione di sputo, conservato a fresco, è stato processato entro due ore dalla raccolta. Vengono selezionati i frustoli (per ridurre la contaminazione da parte delle cellule squamose) e le cellule vengono separate utilizzando come

mucolitico il ditioeritritolo (DTE). La sospensione è stata filtrata e centrifugata: un'aliquota di supernatante è stata conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$  ed utilizzata per l'infezione del monostrato cellulare. Un'aliquota di cellule è stata risospesa con il Trypan blue, che permette di distinguere le cellule vitali da quelle morte, ed è stata eseguita la conta in camera emocitometrica di Neubauer; l'alterata permeabilità di membrana delle cellule morte permette la penetrazione del colorante all'interno della cellula stessa, e quindi appaiono blu all'osservazione al microscopio ottico. Il pellet cellulare viene risospeso in PBS alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml e utilizzato per allestire i cytospin per l'identificazione diretta con Pathfinder® Chlamydia Culture Confirmation System (Bio-Rad). Un'aliquota di pellet cellulare viene conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per successive indagini di proteomica e trascrittomica.

Il siero è stato ottenuto da prelievi ematici effettuati il giorno di raccolta della sputo indotto e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi mediante microimmunofluorescenza.

## METODO COLTURALE

Per l'identificazione e la propagazione di *C.pneumoniae* sono state utilizzate cellule epiteliali in linea continua HEp-2 (ATCC CCL-23™), provenienti da carcinoma laringeo umano, sensibili alla crescita di *C.pneumoniae*. Tali cellule sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato con L-glutamina (2mM), streptomicina (100µg/ml), amfotericina B (2,5µg/ml) NEAA (1%), Na-piruvato (1%) e 10% di siero bovino fetale (FCS) inattivato e poste in incubatore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> per consentire il mantenimento del pH. La concentrazione del siero veniva ridotta al 2% per il mantenimento cellulare. Le cellule venivano mantenute in monostrato effettuando un cambio del mezzo di coltura ogni 2 giorni, sub-coltivate ogni 4 giorni con una concentrazione di 2,5x10<sup>5</sup> cellule/ml in fiasche da 75 o 25 cm<sup>2</sup>. Per il passaggio cellulare veniva utilizzata una soluzione tamponata di tripsina L'isolamento della clamidia veniva effettuato infettando con 200µl del sopranatante proveniente dal processamento dello sputo monostrati semiconfluenti di HEp2 in piastre a 24 pozzetti. Le piastre venivano centrifugate a 1250xg a 35°C per 60 minuti per favorire l'adsorbimento dei corpi elementari eventualmente

presenti e successivamente venivano incubate in termostato per 48-72 ore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>, con terreno post-infezione costituito da DMEM completo addizionato con cicloeximide (1µg/ml), 1% di glucosio e 2% FCS. L'incorporazione di cicloeximide nel terreno ha lo scopo di aumentare la sensibilità delle colture cellulari inibendo il metabolismo delle cellule eucariotiche. Dopo tale periodo il monostrato veniva raccolto, sonicato, centrifugato a bassa velocità ed utilizzato per i passaggi successivi. Come controllo positivo venivano utilizzati i ceppi TWAR CDC/CWL-029 (ATCC No VR-1310™), AR-39 (ATCC No 53592™) e CM-1 (ATCC No VR-1360™) mantenuti nelle stesse condizioni di crescita. Per l'identificazione della clamidia veniva effettuato un passaggio su HEp2 cresciute in vetrini idonei per l'esecuzione della colorazione di Giemsa. Nella colorazione di Giemsa i vetrini vengono fissati in metanolo, colorati con una soluzione al 10% di Giemsa in PBS e lasciati al buio per 30 minuti. Successivamente si effettua un lavaggio con una soluzione al 30% di metanolo in PBS e due lavaggi con PBS. Quando i vetrini sono asciutti vengono montati con Entellan ed osservati al microscopio ottico a 40X e 100X per determinare la presenza delle tipiche inclusioni clamidiali di colore rosso-bluastrò.

## **IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA**

La presenza della clamidia è stata investigata mediante ricerca diretta del patogeno per immunofluorescenza (DFA) sui vetrini cytospin preparati con le cellule ottenute dal processamento dello sputo. Il test utilizzato è stato il Pathfinder® Chlamydia Culture Confirmation System (Bio-Rad) che prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale murino anti-LPS clamidiale marcato con fluoresceina. I vetrini venivano fissati con metanolo a temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) per 15 minuti e asciugati all'aria. Per la colorazione si procedeva dispensando una goccia (circa  $30\mu\text{l}$ ) di anticorpo monoclonale sullo strato di cellule fino a ricoprire completamente lo spot e si incubavano a temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) per 30 minuti in camera umida, al riparo dalla luce intensa. Un campione positivo e uno negativo venivano inclusi in ogni esperimento. Quindi i vetrini venivano lavati gentilmente con acqua deionizzata per eliminare l'anticorpo non legato, asciugati all'aria e montati con il vetrino coprioggetto ed osservati con il microscopio a fluorescenza (Leica DM LB) a 40X-100X.

All'osservazione i campioni positivi alla clamidia presentano una fluorescenza di colore verde mela brillante a forma di cielo stellato sulle

cellule o all'interno delle inclusioni cellulari, in prossimità del nucleo. La presenza di una o più inclusioni determina un risultato positivo. Il colorante di contrasto Blu Evans colora di rosso le cellule.

## **SAGGIO DI MICROIMMUNOFLUORESCENZA**

Nel siero ottenuto dal prelievo venoso periferico dei pazienti sono stati ricercati gli anticorpi specifici IgG, IgM, IgA anti-*C.pneumoniae* mediante microimmunofluorescenza utilizzando il Micro-IF test kit (Labsystem-DASIT). Il test di microimmunofluorescenza (MIF) impiega i corpi elementari delle tre specie (*C.pneumoniae*, *C.trachomatis* e *C.psittaci*), purificati, inattivati e fissati in spot differenti su un vetrino da microscopio. I corpi elementari di *C.trachomatis* e *C.psittaci* sono inclusi nel test come controlli.

Per diminuire la reattività crociata tra le diverse specie di clamidia l'attività immunologica degli antigeni di *C.pneumoniae* e *C.trachomatis* è stata appositamente ridotta. L'antigene della *C.psittaci* non è stato sottoposto ad alcun trattamento: questo antigene serve da controllo per i sieri positivi all'LPS e a *C.psittaci*.

Sono state preparate le diluizioni al raddoppio dei sieri a partire da una diluizione 1/8 del campione in esame. Un campione positivo a *C.pneumoniae* e uno negativo venivano inclusi in ogni esperimento. La minima diluizione testata è stata per le IgM 1/16, per le IgG e le IgA 1/32. Ai pozzetti contenenti i corpi elementari inattivati ed adsorbiti sono stati aggiunti 10µl delle diluizioni dei sieri precedentemente preparate e quindi incubati in camera umida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  per un tempo variabile dai 30 minuti alle tre ore a seconda della classe di anticorpo da individuare, al buio. Dopo incubazione l'eccesso di siero veniva rimosso mediante lavaggi con PBS e acqua deionizzata, venivano aggiunti anti-anticorpi umani coniugati con FITC e i vetrini venivano incubati in camera umida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti. Quindi venivano lavati con PBS e acqua deionizzata, asciugati e montati per la lettura al microscopio a fluorescenza (Leica DM LB) a 40X.

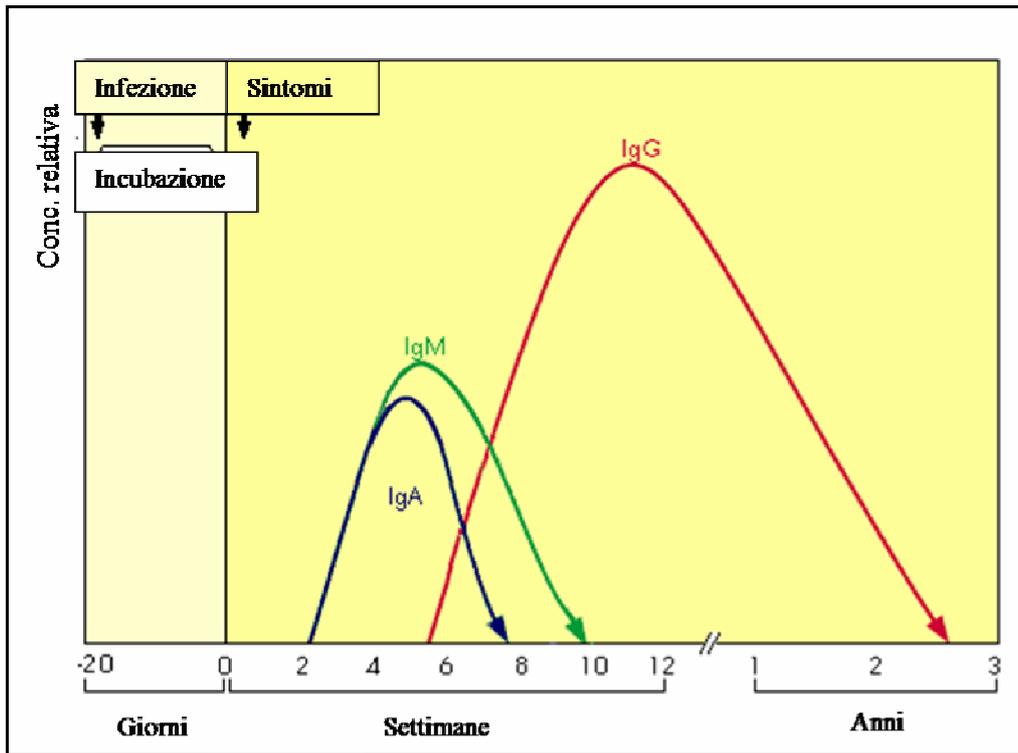
All'osservazione i campioni positivi alla *Chlamydothyla* presentano i corpi elementari fluorescenti di colore verde mela, colorati uniformemente e di uguali dimensioni.

Nell'infezione primaria da *C.pneumoniae* la cinetica anticorpale è di tipo ritardato: circa due settimane dopo i primi sintomi si ha un aumento dei titoli anticorpali IgM e IgA che raggiungono dopo circa 5 settimane il loro

massimo per poi scendere nuovamente all'incirca entro la decima settimana. Nell'infezione primaria la risposta IgA può anche essere assente o estremamente debole se paragonata ai livelli di IgG. Successivamente alla comparsa delle IgM e IgA, inizia la produzione di anticorpi IgG che, dopo un breve periodo raggiungono un massimo e, successivamente, possono persistere per diversi anni. A seguito di una nuova infezione/reinfezione si ha generalmente un rapido aumento della presenza delle IgG e IgA, mentre non c'è alcuna risposta IgM.

La figura 4 illustra schematicamente le cinetiche anticorpali dopo infezione con clamidia.

Dal punto di vista sierologico la diagnosi di infezione acuta si effettua su coppie di sieri prelevati a intervalli di 3-5 settimane che mostrano una sieroconversione oppure un aumento di almeno quattro volte del titolo anticorpale quando siamo in presenza di una nuova infezione/reinfezione.



**Figura 4** Cinetiche degli anticorpi dopo un'infezione da clamidia.

## **DIAGNOSTICA MOLECOLARE**

### **ESTRAZIONE DEL DNA**

Per l'estrazione e la purificazione del DNA genomico è stato utilizzato un kit commerciale, il QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN). Il campione utilizzato è stato ottenuto dal trattamento dello sputo ed era pari a  $1 \times 10^6$  cellule risospese in un volume finale di 200 $\mu$ l di PBS. Seguendo il protocollo d'estrazione del kit il campione è stato trattato con 20 $\mu$ l di proteinasi K e lisato con 200 $\mu$ l di buffer di lisi e incubato alla temperatura di 56°C per 10 minuti. Successivamente l'acido nucleico viene precipitato con l'aggiunta di 200 $\mu$ l di isopropanolo in specifiche colonnine di separazione dotate di membrane in silicio, e purificato, in seguito a lavaggi con due diversi tamponi tramite centrifugazioni a 6.000xg per 1 minuto. Infine il DNA legato alla membrana è stato recuperato utilizzando un tampone a pH alcalino e centrifugando per 1 minuto a 6.000xg. Il DNA è stato eluito in 100 $\mu$ l di buffer AE e conservato a -20°C.

## REAL-TIME PCR

Sul DNA estratto è stata effettuata una Real Time PCR utilizzando il *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydothila pneumoniae* Real-TM kit (Sacace Biotechnologies) che consente un'analisi qualitativa della presenza del microrganismo. Questo kit ricerca anche la presenza di materiale genomico di *Mycoplasma pneumoniae* consentendo di verificare l'eventuale coinfezione nei pazienti. Per eseguire la Real Time è stato utilizzato lo strumento Rotor Gene 6000 (Quiagen) in dotazione presso l'IRMA di Acireale. La caratteristica principale di questo apparecchio è quella di essere dotato di un sistema rotante dove vengono posizionati i campioni: il dispositivo è alloggiato all'interno di una camera dove attraverso un sistema di riscaldamento-raffreddamento è possibile sviluppare accurati profili termici per l'amplificazione e il rilevamento degli ampliconi. La peculiarità del sistema rotante è quella di assicurare l'uniformità della temperatura di lavoro in tutti i campioni contemporaneamente, i quali ruotano continuamente durante l'amplificazione alla velocità di 400gpm (giri per minuto). Lo strumento possiede un sistema di rilevazione in fluorescenza per l'analisi e la quantificazione dei prodotti di amplificazione. I campioni vengono

eccitati dal fondo della camera attraverso un LED (Light Emitting Diode, diodo ad emissione luminosa) e l'energia viene trasmessa attraverso la base delle provette. La fluorescenza emessa passa attraverso i filtri di emissione ai lati della camera e viene catturata da un fotomoltiplicatore. Il percorso ottico fisso assicura l'eccitazione uniforme di ogni singolo campione durante la rotazione nella camera. L'apparecchio è collegato ad un computer che, tramite un apposito software, consente di seguire l'andamento della reazione di amplificazione in tempo reale e successivamente di analizzare i risultati calcolando il valore del Ct (threshold cycle). Il Ct è il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold, o soglia di rilevabilità, che è la linea soglia scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale.

Questo kit utilizza una miscela di reazione con sonde specifiche marcate con diversi fluorocromi per il rilevamento in tempo reale di *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e il controllo interno. Le regioni target sono: i geni per le lipoproteine putative per *M.pneumoniae* e ompA per *C.pneumoniae*. Il kit contiene anche un controllo interno che serve come controllo di amplificazione per ogni

campione processato e per identificare possibili reazioni di inibizione dell'amplificazione. La specificità del kit è del 100% e non sono state descritte reazioni di cross-reattività con altri patogeni. La sensibilità del kit è pari a 500 copie/ml.

La PCR è stata condotta secondo metodica fornita nel kit; il volume finale di reazione è stato di 25µl e il protocollo di amplificazione il seguente:

- 95° - 5 min ;
- 10 cicli A: 95° - 10 sec, 63° - 30 sec, 72° - 10 sec ;
- 35 cicli B: 95° - 10 sec, 60° - 30 sec, 72° - 10 sec.

L'acquisizione della fluorescenza nei tre diversi canali Fam (Green), Joe (Yellow) e Rox (Orange) avviene al secondo passaggio della serie dei cicli B (a 60° per 30 sec).

Sono stati utilizzati cinque diversi controlli:

- DNA-buffer: controllo negativo di amplificazione;
- *Chlamydia pneumoniae* C+: controllo positivo per *C.pneumoniae*;
- *Mycoplasma pneumoniae* C+: controllo positivo per *M.pneumoniae*;
- controllo interno IC: controllo interno di amplificazione;
- NCS: controllo negativo di estrazione.

## RISULTATI

I pazienti sono stati sottoposti al prick-test per valutare lo stato atopico: l'atopia è stata definita da almeno una risposta positiva.

I risultati relativi al prick-test e al dosaggio delle IgE specifiche sieriche sono mostrati in Tabella 1.

Almeno un risultato positivo al prick-test è stato trovato nel 76% dei pazienti asmatici (19/25) e nell'80% del gruppo di controllo (8/10). Le sensibilizzazioni più comuni nei soggetti asmatici sono risultate essere per gli acari della polvere, le graminacee e l'olivo.

Per quanto concerne il dosaggio delle IgE totali nel 48% dei pazienti asmatici (12/25) e nel 40% dei soggetti del gruppo di controllo (4/10) sono risultati valori sopra la norma (0-100 UI/ml).

	<b>Asmatici n=25</b>	<b>Controlli n=10</b>
Positivi ad almeno un allergene	19 (76%)	8 (80%)
<i>Dermatophagoides pteronyssinus e farinae</i>	8 (32%)	3 (30%)
Mix graminacee	7 (28%)	5 (50%)
Mix alberi	2 (8%)	1 (10%)
Cane	3 (12%)	1 (10%)
Gatto	5 (20%)	6 (60%)
Ambrosia	4 (16%)	0 (0%)
Alternaria	1 (4%)	0 (0%)
Olivo	7 (28%)	2 (20%)
IgE totali > 100 UI/ml	12 (48%)	4 (40%)

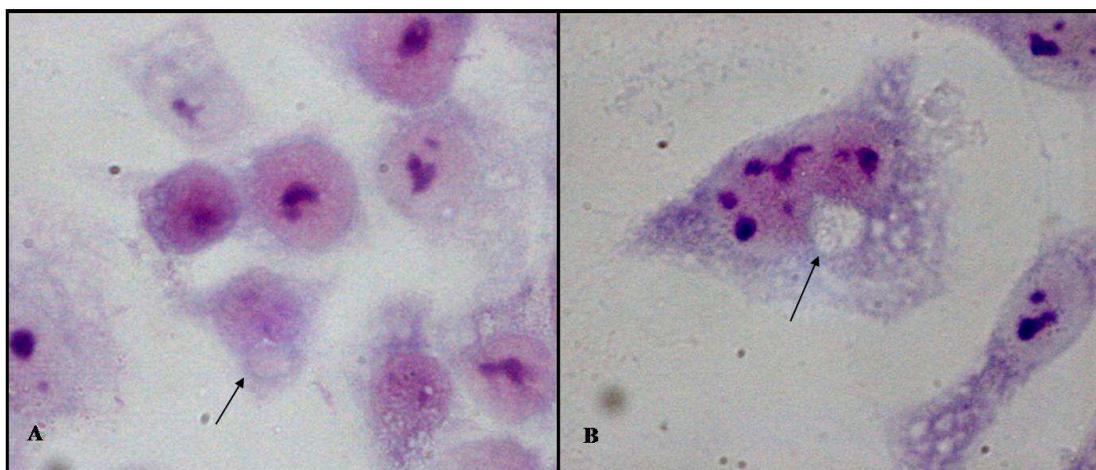
**Tabella 1** Risultati del prick test e del dosaggio delle IgE nei soggetti asmatici e nel gruppo controllo.

La conferma della presenza di *C.pneumoniae* dipende dal suo reperimento in un appropriato campione clinico del paziente, seguito dal diretto riconoscimento del microrganismo, usando un valido test diagnostico di laboratorio.

Il metodo di raccolta del campione mediante induzione dello sputo non è invasivo ma comporta significativi svantaggi, infatti la concentrazione di cloruro di sodio inalata può comportare broncocostrizione quindi non può essere usato in caso di asma stabile con valori di FEV1 (la quantità d'aria espulsa dai polmoni in un secondo)  $< 70\%$  del valore di riferimento atteso e ciò ha impedito la raccolta del campione per svariati pazienti arruolati. Tutti i soggetti del gruppo di controllo (100%) e il 36% dei pazienti asmatici (9/25) avevano valori di FEV1  $> 70\%$  del valore di riferimento atteso. Dei 25 pazienti asmatici arruolati solo il 52% (13/25) ha prodotto sputo; nei soggetti del gruppo controllo è stata effettuata anche l'induzione dello sputo: solo il 30% dei soggetti (3/10) ha prodotto sputo.

L'isolamento colturale della *C.pneumoniae* non ha fornito risultati attendibili a causa delle caratteristiche intrinseche del campione che è risultato essere contaminato da batteri e miceti.

La figura 5 mostra le tipiche inclusioni clamidiali visibili con la colorazione Giemsa nei vetrini di controllo positivo ottenuti infettando cellule HEp2 con i ceppi CM-1 e TWAR CDC/CWL-029, osservati al microscopio ottico a 40X e 100X.



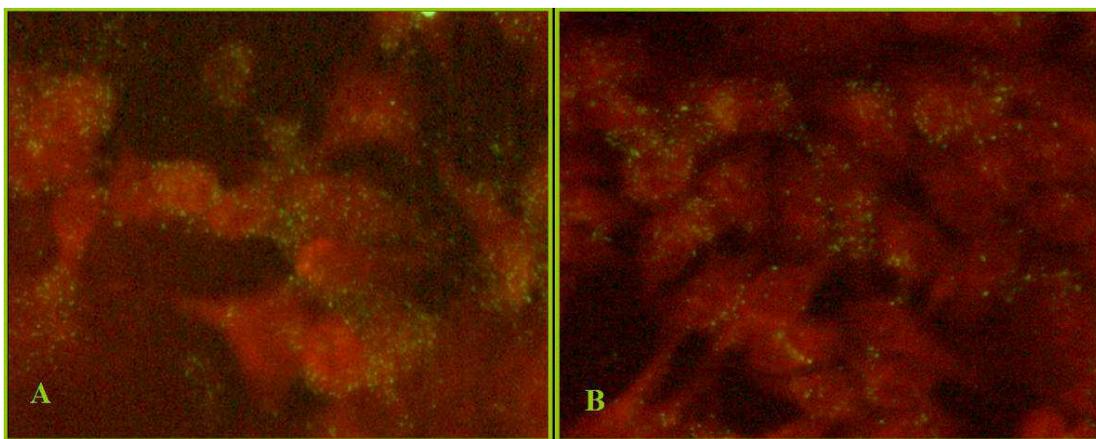
**Figura 5** Tipiche inclusioni clamidiali ottenute infettando cellule HEp2 con i ceppi CM-1 (A) e TWAR CDC/CWL-029 (B), colorate con Giemsa e osservate al microscopio ottico a 40X (A) e 100X (B).

Il test di immunofluorescenza diretta (Pathfinder®) ci permette di rilevare la fluorescenza clamidiale di colore verde mela brillante a forma di cielo stellato sulle cellule o all'interno delle inclusioni cellulari.

La presenza di una o più inclusioni determina un risultato positivo. Il Blu Evans è utilizzato come colorante di contrasto e colora di rosso le cellule.

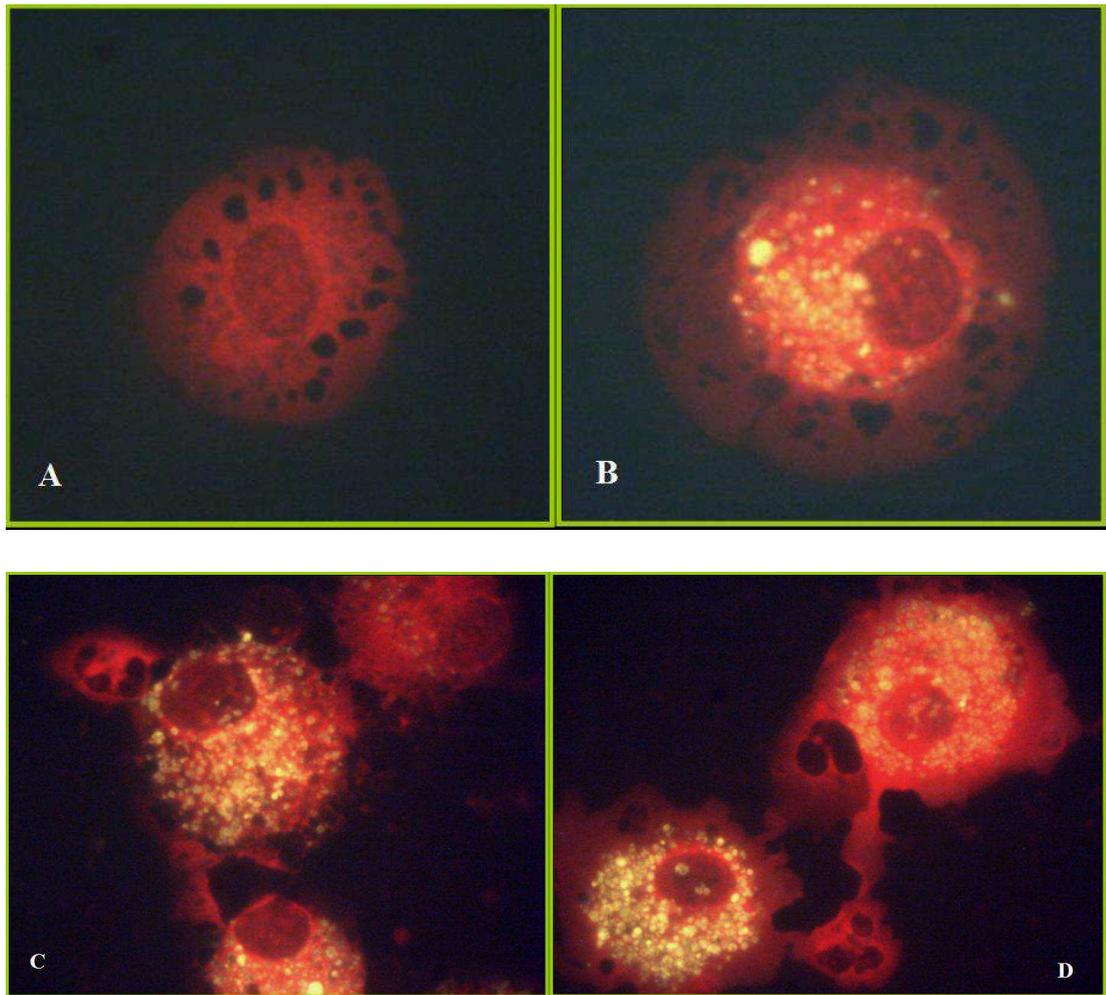
La figura 6 mostra i risultati dei vetrini di controllo positivo ottenuti

infettando le cellule HEp2 con i ceppi TWAR CDC/CWL-029 e CM-1, osservati al microscopio a fluorescenza a 40X e 100X.



**Figura 6** Tipiche inclusioni clamidiali ottenute infettando cellule HEp2 con i ceppi TWAR CDC/CWL-029 (A) e CM-1 (B), e osservate al microscopio a fluorescenza a 40X.

L'identificazione mediante Pathfinder® sui cytopspin dei pazienti asmatici ha rilevato una debole fluorescenza nel 18,7% dei campioni (3/16) (positività all'LPS). La figura 7 mostra i risultati dell'osservazione dei tre campioni.



**Figura 7** Foto al microscopio a fluorescenza (100X) dell'osservazione dei cytospin analizzati con Pathfinder®: **(a)** cellula negativa; **(b)** **(c)** **(d)** campioni che hanno mostrato una debole fluorescenza.

Il siero per la ricerca degli anticorpi specifici è stato ottenuto da prelievi ematici nel 100% dei soggetti controllo (10/10) e nell'80% dei pazienti asmatici (20/35).

Nei soggetti del gruppo di controllo non è stata rilevata la presenza di IgM e IgA specifiche, mentre il 30% (3/10) presentava IgG con titolo di 32.

Nei soggetti asmatici non è stata rilevata la presenza di IgM specifiche mentre sono state rilevate IgG specifiche nel 50% dei soggetti (10/20) e IgA nel 20% (4/20). I titoli anticorpali ottenuti sono mostrati in Tabella 2.

	<b>Età</b>	<b>Ig G</b>	<b>IgM</b>	<b>IgA</b>
Paziente n° 13	69	32	–	–
Paziente n° 15	46	32	–	–
Paziente n° 19	39	32	–	32
Paziente n° 21	41	128	–	–
Paziente n° 22	26	256	–	32
Paziente n° 23	49	64	–	–
Paziente n° 24	35	32	–	–
Paziente n° 28	49	32	–	64
Paziente n° 29	59	32	–	–
Paziente n° 30	49	128	–	64

**Tabella 2** Titoli degli anticorpi specifici rilevati nei soggetti asmatici ed età dei pazienti con sieropositività.

Per l'interpretazione dei risultati della Real Time PCR sono stati utilizzati i parametri indicati in Tabella 3.

<b>Controllo</b>	<b>Step di controllo</b>	<b>Ct canale Fam/Green</b>	<b>Ct canale Joe/Yellow</b>	<b>Ct canale Rox/Orange</b>	<b>Interpretazione</b>
NCS	Isolamento DNA	Negativo	Positivo	Negativo	Risultato valido
DNA-buffer	Amplificazione	Negativo	Negativo	Negativo	Risultato valido
Chl. pneum C+	Amplificazione	Negativo	Negativo	Positivo (< 33)	Risultato valido
Myc. pneum C+	Amplificazione	Positivo (< 33)	Negativo	Negativo	Risultato valido
IC DNA	Amplificazione	Negativo	Positivo (< 31)	Negativo	Risultato valido

**Tabella 3** Parametri per l'interpretazione dei risultati della Real Time.

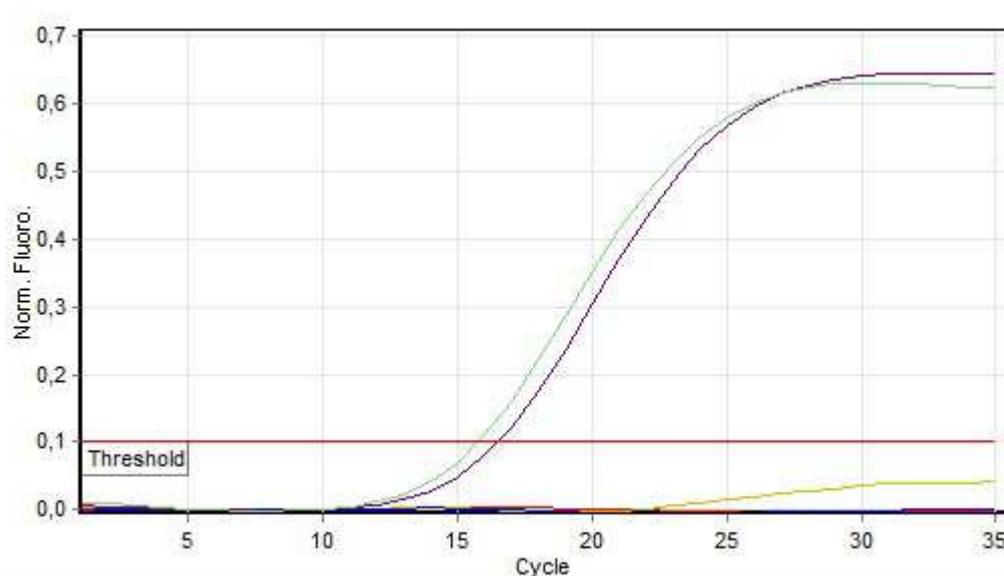
Il campione è considerato positivo per *C.pneumoniae* se nel canale Rox (Orange) il valore del Ct è diverso da zero (Ct < 33);

il campione è considerato positivo per *Mycoplasma pneumoniae* se nel canale Fam (Green) il valore del Ct è diverso da zero ( $Ct < 33$ );

il campione è considerato negativo se nel canale Fam (Green) e Rox (Orange) il valore del Ct non è determinato e nel canale Joe (Yellow) il valore del Ct è più basso di 31.

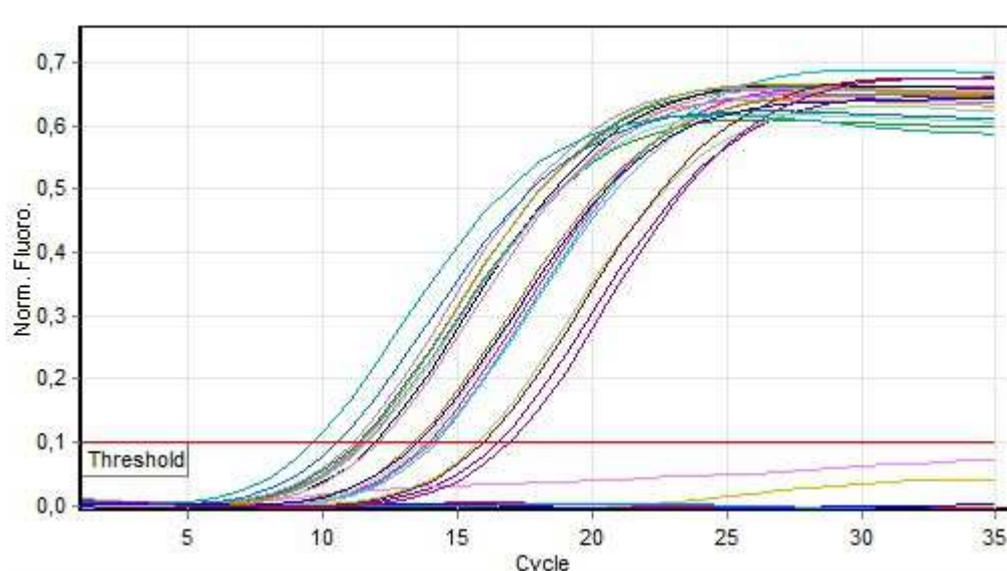
La Figura 8 mostra i risultati nel canale Joe (Yellow) per il pannello di controllo: tutti i risultati sono validi.

No.	Colour	Name	Type	Ct
1	Red	Chl. pneum C+	Positive Control	Neg
2	Yellow	Myc pneum C+	Positive Control	Neg
3	Blue	DNA buffer	Negative Control	Neg
4	Purple	IC DNA	Unknown	16,51
5	Green	NCS	Unknown	15,78



**Figura 8 Quantitation data for Cycling B.Yellow.** Curve di amplificazione dei campioni di controllo nel canale Joe. In tabella sono indicati i valori di Ct dei campioni positivi.

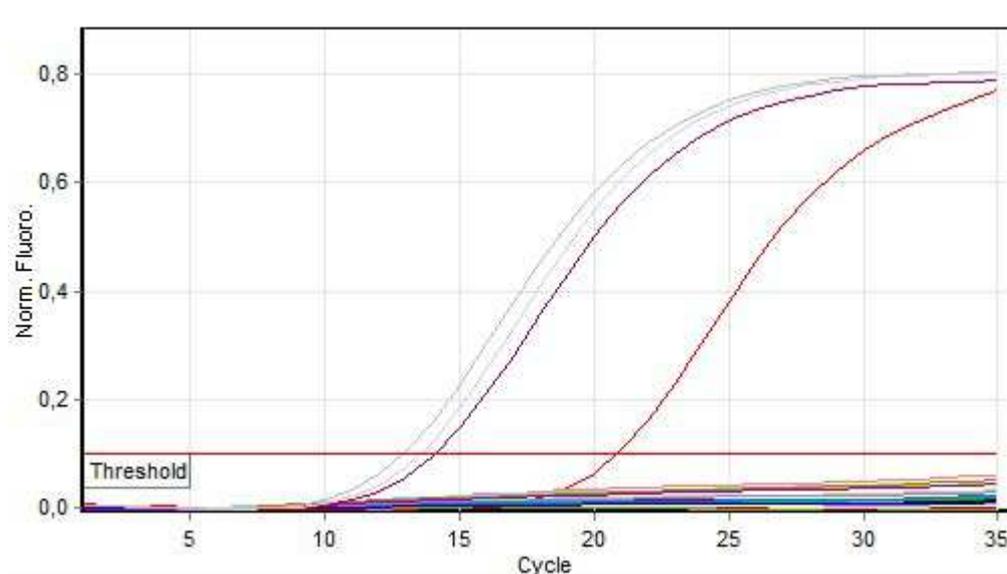
La Figura 9 mostra i risultati nel canale Joe (Yellow) per tutti i campioni analizzati: tutti i risultati sono validi.



**Figura 9 Quantitation data for Cycling B.Yellow.** Curve di amplificazione dei campioni analizzati nel canale Joe.

La Figura 10 mostra i risultati nel canale Rox (Orange) per tutti i campioni analizzati: tutti i risultati sono validi. Le curve di amplificazione sono visibili per il controllo positivo di *C.pneumoniae* del kit e per i ceppi TWAR CDC/CWL-029 (ATCC No VR-1310™), AR-39 (ATCC No 53592™) e CM-1 (ATCC No VR-1360™) utilizzati come controllo interno positivo. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi.

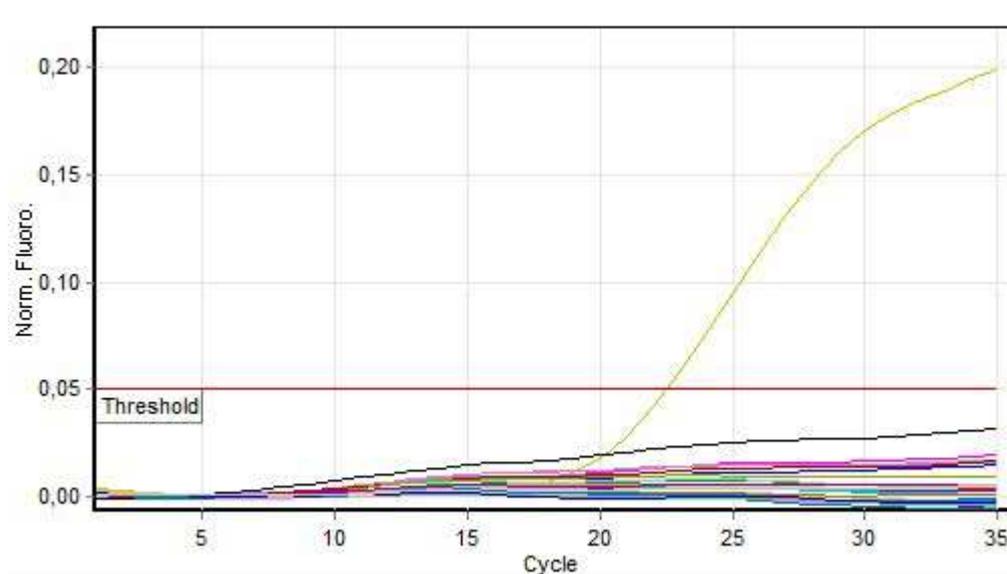
No.	Colour	Name	Type	Ct
1	■	Chl. pneum C+	Positive Control	20,83
2	■	Myc pneum C+	Positive Control	
3	■	DNA buffer	Negative Control	
4	■	IC DNA	Unknown	
5	■	NCS	Unknown	
27	■	AR-39	Unknown	14,08
28	■	TWAR	Unknown	13,53
29	■	CM1	Unknown	12,90



**Figura 10 Quantitation data for Cycling B.Orange.** Curve di amplificazione dei campioni analizzati nel canale Rox. In tabella sono indicati i valori di Ct dei campioni positivi.

La Figura 11 mostra i risultati nel canale Fam (Green) per tutti i campioni analizzati: tutti i risultati sono validi. La curva di amplificazione è visibile solo per il controllo positivo di *Mycoplasma pneumoniae* del kit. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi.

No.	Colour	Name	Type	Ct
1	■	Chl. pneum C+	Positive Control	
2	■	Myc pneum C+	Positive Control	22,55
3	■	DNA buffer	Negative Control	
4	■	IC DNA	Unknown	
5	■	NCS	Unknown	



**Figura 11. Quantitation data for Cycling B.Green.** Curve di amplificazione dei campioni analizzati nel canale Fam. In tabella sono indicati i valori di Ct dei campioni positivi.

## **DISCUSSIONE**

Ogni anno in Sicilia si registrano circa 6000 ricoveri ospedalieri per asma bronchiale. Secondo i dati forniti dal Dipartimento Attività Sanitarie ed Osservatorio Epidemiologico dell'Assessorato alla Sanità della Regione Siciliana, il 5% della popolazione presenta sintomi asmatici. I più colpiti sono i bambini e gli adolescenti.

La prevalenza dell'asma in Italia è del 5-7% nella popolazione adulta. L'asma grave, che colpisce 2 abitanti su 100.000, comporta una elevata limitazione delle normali attività giornaliere, dovuta a una notevole riduzione della funzionalità respiratoria causata, a sua volta, da alterazioni strutturali delle vie respiratorie che provocano una ostruzione bronchiale persistente. In questo ambito, l'efficacia della terapia farmacologica è fortemente ridotta e spesso inadeguata ad ottenere un accettabile controllo dell'asma, nonostante la somministrazione di elevate dosi di farmaci, come i glucocorticoidi, generalmente efficaci nella maggior parte dei pazienti.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità, stima che al mondo circa trecento milioni di persone siano affetti da asma, pertanto il problema è molto sentito negli ambienti sanitari.

Le infezioni respiratorie possono avere un ruolo importante sia nella comparsa dell'asma che nello scatenare la riacutizzazione in molti pazienti. Le indagini epidemiologiche hanno dimostrato un'aumentata prevalenza di sintomi asmatici nei soggetti con pregresse e frequenti infezioni respiratorie che contribuiscono al potenziamento della risposta infiammatoria bronchiale.

E' anche opportuno considerare che, mentre il ruolo dell'infezione da batteri atipici, quali clamidia e micoplasma, è noto negli episodi di riacutizzazione, risulta essere poco studiato il loro ruolo sul controllo dell'asma grave.

Dal momento che un'infezione non diagnosticata, e quindi non trattata, da *C.pneumoniae* può essere causa di una patologia cronica<sup>[70]</sup>, è cruciale che la malattia sia diagnosticata e trattata tempestivamente.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di rilevare l'eventuale infezione da *Chlamidophyla pneumoniae* nei soggetti asmatici per poter confermare e valutare il grado di coinvolgimento di questo patogeno

nell'asma grave e al fine di fornire un trattamento terapeutico specifico per tali soggetti.

Nonostante il notevole tempo trascorso da quando venne suggerito per la prima volta che *C.pneumoniae* potesse causare infezioni acute delle vie respiratorie, la diagnosi rimane ancora difficile e risente della mancanza di un "gold standard".

Le colture cellulari sono spesso poco utilizzate in ambito diagnostico poiché richiedono laboratori attrezzati, tempi molto lunghi e una buona esperienza e praticità dell'operatore. Possono presentare una scarsa sensibilità, dipendente in gran parte dalle condizioni del campione, sono sensibili alla contaminazione batterica e alle sostanze tossiche che possono eventualmente essere presenti nel campione di partenza. Tuttavia si ritiene di poter affermare che il loro utilizzo rimane un riferimento essenziale per l'identificazione e l'isolamento della clamidia. Attualmente nella diagnosi sierologica il test più accreditato è quello di microimmunofluorescenza (MIF)<sup>[36]</sup> che è ritenuto altamente sensibile e specifico e consente di distinguere le tre classi immunoglobuliniche IgM, IgG e IgA. La diagnosi sierologica è tuttavia sempre posta su base retrospettiva e non è pertanto di alcun ausilio clinico-terapeutico immediato a meno che siano presenti anticorpi di classe IgM e che la

sintomatologia clinica sia patognomica. Inoltre i risultati dei test MIF sono semiquantitativi e soggettivi, poiché legati all'esperienza dell'operatore e variabili in relazione alla differente origine e preparazione degli spot antigenici fissati sul vetrino<sup>[36,71,72]</sup>.

La ricerca di anticorpi clamidiali risulta quindi essere solo di supporto alla diagnosi di infezione da *C.pneumoniae*.

La Real-time PCR è un metodo efficace per rivelare la presenza di *C.pneumoniae* nel campione di sputo ottenuto per induzione<sup>[73]</sup>. Il gene della proteina principale di membrana esterna (MOMP) è stato precedentemente dimostrato essere un buon marcatore genetico per *C.pneumoniae* in altri studi basati su real-time PCR<sup>[74,75]</sup>.

L'amplificazione degli acidi nucleici tramite PCR è una tecnica molto rapida ma ogni protocollo ha una sua specificità e sensibilità.

## CONCLUSIONI

Il ruolo delle infezioni di batteri atipici, quali *Chlamydophila pneumoniae*,<sup>[4]</sup> nella patogenesi dell'asma è controverso.

Negli ultimi anni prove cliniche e sperimentali hanno dimostrato che le infezioni respiratorie hanno un ruolo importante nello sviluppo dei sintomi dell'asma nei soggetti adulti e nei bambini<sup>[53,54,55]</sup>, nella sua esacerbazione<sup>[57]</sup> e potrebbero essere coinvolte nell'asma cronica, mentre non è nota l'influenza di questi patogeni nel controllo dell'asma grave a lungo termine<sup>[64]</sup>.

Evidenze a favore di questa associazione vengono anche da studi che rilevano come alcuni soggetti infetti, trattati con farmaci anticlamidiali, hanno riportato miglioramenti nei sintomi asmatici<sup>[60,61]</sup>.

Le numerose evidenze provenienti da studi siero-epidemiologici hanno dimostrato che molti asmatici hanno livelli elevati di anticorpi anti-*C.pneumoniae*<sup>[63]</sup>. Tuttavia, è importante notare che le prove di un'associazione tra l'infezione di batteri atipici e l'asma non dimostrano un ruolo diretto causa-effetto nella patogenesi dell'asma, bensì potrebbero indicare una maggiore suscettibilità alle infezioni che determina una maggiore frequenza di rilevamento. L'ipotesi più

probabile è che la maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie nei soggetti asmatici porta ad un aumento delle infezioni da parte di batteri atipici, che svolgono un ruolo diretto nell'incremento dell'infiammazione delle vie aeree, contribuendo direttamente alla patogenesi dell'asma<sup>[4,64]</sup>.

L'indagine sulla potenziale associazione tra *C.pneumoniae* e l'asma è fortemente ostacolata dalla mancanza di metodi standardizzati, sensibili e specifici per la rilevazione di questo agente patogeno. Un ulteriore ostacolo è rappresentato dalla difficoltà (sia in termini pratici che etici) nel campionamento del tratto respiratorio inferiore nelle popolazioni rappresentative di pazienti con asma e soggetti di controllo<sup>[4]</sup>.

Dai nostri dati emerge la presenza di IgG anti-*C.pneumoniae* nel 50% dei sieri dei soggetti asmatici esaminati e di IgA nel 20% dei sieri che ci porta a considerare la notevole circolazione della *C.pneumoniae* in questi soggetti che presentano una patologia respiratoria di base e che tuttavia non correlano con i dati di rilevamento e isolamento della *C.pneumoniae* nei campioni analizzati, probabilmente a causa delle caratteristiche intrinseche e quantitative del campione stesso. Presumibilmente, la maggior parte delle persone si infetta con *C.pneumoniae* almeno una volta nella vita. Le percentuali di sieroprevalenza aumentano rapidamente in età prescolare e superano il 50% dopo l'adolescenza. In

età più avanzata, la prevalenza di *C.pneumoniae* aumenta ulteriormente a causa delle frequenti infezioni ricorrenti e della sua propensione a causare malattie croniche. Oltre i 65 anni di età, la sieroprevalenza può raggiungere il 70-100%<sup>[76,16,77]</sup>.

Bisogna sottolineare che la diagnosi non deve mai basarsi esclusivamente sui dati sierologici che devono essere interpretati tenendo in considerazione il quadro clinico e altri reperti diagnostici.

In conclusione, sono necessari ulteriori studi, su un numero maggiore di campioni e prevedendo la possibilità di monitorare nel tempo i pazienti per ripetere le prove sperimentali negli eventuali episodi di esacerbazione che determinano ad un aggravio del quadro clinico stesso, per valutare se l'infezione di patogeni atipici quali la *C.pneumoniae* per le sue caratteristiche peculiari possa concorrere, in una fase iniziale e/o avanzata, come agente eziologico o concausa nella gravità o nell'esacerbazione della malattia asmatica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thon DH & Wang SP (1990). A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 161: 618–625.
- [2] Grayston JT, Aldous MB & Easton A (1993). Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J Infect Dis* 168: 1231–1235.
- [3] Hahn DL, Dodge RS & Golubjatnikov R (1991). Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, adult-onset asthma. *J Am Med Assoc* 266: 225–230.
- [4] Johnston SL, Martin RJ (2005). *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*: a role in asthma pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med*. 172:1078–89 Review.
- [5] Grayston JT. (2000). Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis*; 181 (Suppl 3): S402–S410.
- [6] Belland RJ, Ouellette SP, Gieffers J & Byrne GI (2004). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell Microbiol* 6: 117–127.

- [7] Balin BJ, Gérard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (1998). Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 187: 23–42.
- [8] Gérard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, Frey WH II, Bordayo EZ, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (2006). *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48: 355–366.
- [9] Shima K, Kuhlenbäumer G, Rupp J (2010). *Chlamydia pneumoniae* infection and Alzheimer's disease: a connection to remember? *Med Microbiol Immunol* 199:283–289.
- [10] Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD & Mitchell WM (1999). *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46: 6–14.
- [11] Stratton CW, Wheldon DB (2006). Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving *Chlamydophila pneumoniae*. *Trends Microbiol* 14: 474–479.
- [12] Fainardi E, Castellazzi M, Seraceni S, Granieri E, Contini C (2008). Under the microscope: focus on *Chlamydia pneumoniae* infection and multiple sclerosis. *Curr Neurovasc Res* 5: 60–70.

- [13] Micillo E, Bianco A, D'Auria D, Mazzearella G, Abbate GF (2000). Respiratory infections and asthma. *Allergy Suppl* 61:42–5. Review.
- [14] Wang F, He XY, Baines KJ, Gunawardhana LP, Simpson JL, Li F, Gibson PG (2011). Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur Respir J* 38(3):567–74.
- [15] Treccani.it enciclopedia on-line
- [16] Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8(4):451–61. Review
- [17] Everett KD, Bush RM, Andersen AA (1999). 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* 49: 415–440.
- [18] Batteiger BE (1996). The major outer membrane protein of a single *Chlamydia trachomatis* serovar possesses more than one serovar-specific epitope. *Infect. Immun.* 64: 542–547.

- [19] Moulder JW, Hatch TP, Kuo CC, Schachter J (1984). Genus *Chlamydia*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp. 729–739. Edited by N.R. Krieg. Baltimore: Williams & Wilkins
- [20] Kalayoglu MV, Byrne GI (1998). Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 177: 725–9.
- [21] Leinonen M. Immunologia della *Chlamydia pneumoniae*. Mattiolo Ed-Fidenza 1999.
- [22] Kaukoranta-Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M. (1994). *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells *in vitro*. *Microb Pathog* 16: 313–9.
- [23] Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J (1986). A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in respiratory tract infections. *N Engl J Med* 315:161–168.
- [24] “Breve viaggio nel mondo dei microbi e delle malattie infettive” Giordano De Felip Editore Pbi International.
- [25] Hammerschlag MR (2002). The Intracellular Life of *Chlamydiae*. *Semin Pediatr Infect Dis*. 13(4):239–48. Review.

[26] Beatty WL, Morrison RP and Byrne GL (1994). Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Reviews* 58: 686–699.

[27] Harper A, Pogson CI, Jones ML, et al (2000): Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acids levels, and glucose deprivation. *Infect Immun* 68:1457–1464.

[28] Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP and Byrne GI (1994). Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect. Immun.* 62: 3705–3711.

[29] Beatty WL, Morrison RP and Byrne GI (1995). Reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* infection in cell culture. *Infect Immun* 63: 199–205.

[30] Jawetz, Melnick, Adelberg's. *Microbiologia Medica* 21<sup>a</sup> edizione, Ed. Piccin, Cap 28.

[31] Kalman S, Mitchell W, Marathe R et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* 1999; 21: 385–9.

[32] Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M,

Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser CM (2000). Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 28(6):1397–406.

[33] Krüll M, Maass M, Suttorp N, Rupp J (2005). *Chlamydophila pneumoniae*. Mechanisms of target cell infection and activation. *Thromb Haemost* 94(2):319–26. Review.

[34] Ciarrocchi G, Serological diagnosis of Chlamydia infections: proposal of a cost-effective approach. *MICROBIOLOGIA MEDICA*, 2008 Vol. 23 (2).

[35] Blasi F, Tarsia P, Aliberti S (2009). *Chlamydophila pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 15(1):29–35. Review.

[36] Dowell SF et al (2001). Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada), *Clin Infec Dis*, 33:492–503.

[37] Merck Manual, Home Health Handbook

[38] Michela La Placa, Principi di Microbiologia Medica, 12<sup>a</sup> edizione, Esculapio Editore, Cap 38.

[39] Polosa R, Knoke JD, Russo C, Piccillo G, Caponnetto P, Sarv  M, Proietti L, Al-Delaimy WK (2008). Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 121(6):1428–1434.

[40] Global INitiative for Asthma (GINA) PROGETTO MONDIALE ASMA: Linee Guida Italiane Aggiornamento 2011, Modena, 1-3 marzo 2011.

[41] Katia Cuppari, Antonio Di Marco, Iolanda Chinellato, Massimo Pifferi, Fabio Decimo, Michele Miraglia del Giudice, Ahmad Kantar. La misurazione dell'ossido nitrico nell'aria espirata *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 04/2011; 2–8).

[42] Holgate ST, Polosa R (2006). The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* 368:780–793.

[43] Chung KF, Godard P, Adelroth E, et al (1999). Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. ERS Task Force on Difficult/Therapy-Resistant Asthma. European Respiratory Society. *Eur Respir J* 13:1198–1208.

[44] Anon (2000). Proceedings of the ATS Workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered

questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2341–2351.

[45] Anon (2003). The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 22: 470–477.

[46] Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, et al (2007). Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol* 119:1337–1348.

[47] Bush A, Hedlin G, Carlsen KH, et al (2008). Severe childhood asthma: a common international approach? *Lancet* 372:1019–1021.

[48] Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, et al (2010). Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 126:926–938.

[49] Bel EH, Sousa A, Fleming L, Bush A, Chung KF, Versnel J, Wagener AH, Wagers SS, Sterk PJ, Compton CH; Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome (U-BIOPRED) Consortium, Consensus Generation. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax* 2010.153643.

[50] WHO. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma JACI 2010.

[51] Polosa R (2008). An overview of chronic severe asthma. *Intern Med J.* 38(3):190–198. Review.

[52] Polosa R, Morjaria J (2008). Immunomodulatory and biologic therapies for severe refractory asthma. *Respir Med* 102(11):1499–1510. Review.

[53] Esposito S, Blasi F, Arosio C et al (2000). Importance of acute *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children with wheezing. *Eur Respir J* 16: 1142–1146.

[54] Lieberman D, Printz S et al (2003). Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 406–410.

[55] Harju TH, Leinonen M, Nokso-Koivisto J, Korhonen T, Rätty R, He Q, Hovi T, Mertsola J, Bloigu A, Ryttilä P, Saikku P (2006). Pathogenic bacteria and viruses in induced sputum or pharyngeal secretions of adults with stable asthma. *Thorax* (7):579–584.

[56] Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA, et al (1995).

Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 310(6989):1225–1229.

[57] Daian CM, Wolff AH, Bielory L (2000). The role of atypical organisms in asthma. *Allergy Asthma Proc* 21:107–111.

[58] Blasi F, Cosentini R, Tarsia P, et al (2001). Atypical pathogens and asthma: can they influence the natural history of the disease? *Monaldi Arch Chest Dis* 56:276–280.

[59] Emre U, Roblin P, Gelling M, et al (1994). The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airway disease in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 148:727–732.

[60] Hahn DL (1995). Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection in adult asthma: a before-after trial. *J Fam Pract.* 41(4):345–351.

[61] Sutherland ER, Martin RJ (2007). Asthma and atypical bacterial infection. *Chest* 132:1962–1966.

[62] Cunningham AF, Johnston SL, Julios SA, Lamp FC, Ward ME (1998). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. *Eur Respir J* 11:345–349.

- [63] von Hertzen LC (2002). Role of persistent infection in the control and severity of asthma: focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Respir J* 19:546–556.
- [64] Specjalski K, Jassem E. *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* infections, and asthma control (2011). *Allergy Asthma Proc.* 32(2):9–17.
- [65] Cazzola M, Matera MG, Blasi F (2004). Macrolide and occult infection in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 10:7–14.
- [66] Cosentini R, Tarsia P, Canetta C, Graziadei G, Brambilla AM, Aliberti S, Pappalè M, Tantardini F, Blasi F (2008). Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respir Res.* 9:48.
- [67] Wark P, Johnston S, Simpson J, et al (2002). *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin A reactivation and airway inflammation in acute asthma. *Eur Respir J* 20:834–840.
- [68] Allegra L, Blasi F, Centanni S, et al (1994). Acute exacerbations of asthma in adults: Role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J* 7:2165–2168.

[69] GINA. Global strategy for asthma management and prevention, NHLBI/NIH Workshop Report 95-3659. Bethesda, MD: National Heart, Lung and Blood Institute, 1995 – Revised 2006.

[70] Burkhardt O, Straube E, Welte T (2003). Clinical picture, diagnosis and treatment of *Chlamydia pneumoniae*. *Pneumologie* 57(8):449–458.

[71] Herman C, Gueinzius K, Oehme A, Aulock von S, Straube E, Hartung T (2004). Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against *Chlamydia pneumoniae* to microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 42 (6):2476–2479.

[72] Peeling R, Wang SP, Grayston JT, et al (2000). *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 181:S426–S9.

[73] Harju TH, Leinonen M, Nokso-Koivisto J, et al (2006). Pathogenic bacteria and viruses in induced sputum or pharyngeal secretions of adults with stable asthma. *Thorax* 61:579–584.

[74] Kuoppa Y, Boman J, Scott L, et al (2002). Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:2273–2274.

[75] Apfalter P, Barousch W, Nehr M, et al (2003). Comparison of a new quantitative ompA-based real-time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *J Clin Microbiol* 41:592–600.

[76] Campbell LA et al (2004). *Chlamydia pneumoniae* – An infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat. Rev. Microbiol*, 2:23–32.

[77] Tuuminen T et al (2000). Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:734–738.

## **Sitografia**

[www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com)

[www.european-lung-foundation.org](http://www.european-lung-foundation.org)