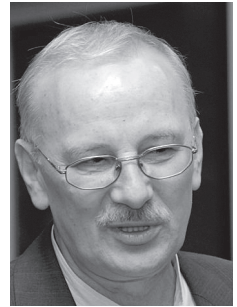


Nie tylko alergeny: *Alternaria alternata*

Not only allergens: *Alternaria alternata*

S U M M A R Y

Fungi of the genus *Alternaria* are common in nature, in homes and buildings. *Alternaria alternata* (Alt a) spores are considered a well-known biological contaminant and a very common potent aeroallergen source. It has been shown that Alt a molds are significant part of microbiocenosis in the archive, museum, library, composting plant and tannery. The profile of allergen release from fungal material is still poorly understood. To date, 11 allergens of Alt a have been isolated and accepted by International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee (IUISA) Alt a 1 glycoprotein is the major allergen causing sensitization in 80% of Alt a-sensitive patients. Alt a 3 causing sensitization in 5%; Alt a 5 in 8-14%, Alt a 6 in 15-43%; Alt a 7 in 7%, Alt a 8 in 41%, Alt a 10 in 2%, Alt a 15 in 10.2 % on immunoblot of Alt a-sensitive patients. Alt a, is strongly associated with asthma, and with increased asthma severity, but the importance of fungal allergen products is frequently underestimated. *Alternaria alternata* produces dangerous to humans and animals mycotoxins: alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), altenuene (ALT), altertoxins I, II, III (ATX-I, II, III) and L-tenuazonic acid (TEA)



Prof. dr hab. n. med.
Krzysztof Buczyłko

Kierownik NZOZ Centrum
Alergologii w Łodzi

Grzyby z rodzaju *Alternaria* są powszechne w naturze, w domach i innych budynkach. Pleśń *A. alternata* (Alt a) stanowi dobrze znane zanieczyszczenie biologiczne oraz bardzo powszechne źródło silnych alergenów powietrzno-pochodnych. Wykazano, że pleśń Alt a stanowi znaczącą część mikrobiocenozy archiwów, muzeów, bibliotek, kompostowni i garbarni. Profil alergenów uwalnianych z tkanek grzyba jest wciąż mało zrozumiały. Obecnie zostało wyizolowane i zatwierdzone przez Podkomitet Nomenklatury Alergenów Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych (IUISA) 11 alergenów Alt a. Glikoproteina Alt a 1 stanowi alergen główny powodujący uczulenie u 80% chorych wrażliwych na Alt a. Alt a 3 powoduje uczulenie u 5%; Alt a 5 wśród 8-14%, Alt a 6 u 15-43%; Alt a 7 u 7%, Alt a 8 u 41%, Alt a 10 u 2%, Alt a 15 u 10,2 % w badaniu immunoblot pacjentów nadwrażliwych na Alt a. Alt a pozostaje silnie związana z występowaniem oraz wzrostem ciężkości astmy, lecz znaczenie alergenów produkowanych przez grzyby bywa często niedoceniane. Wśród szkodliwych dla człowieka mikotoksyn wytwarzanych przez *A. alternata* wymienia się: alternariol (AOH), jednometylowy eter alternariolu (AME), altenuen (ALT), altertoksyny I, II, III (ATX-I, II, III) oraz kwas L-teunazonikowy (TEA)

Buczyłko K.: Nie tylko alergeny: *Alternaria alternata*. *Alergia*, 2016, 4: 17-22

Znaczenie pleśni dla współczesnego człowieka

Wilgotne środowisko wewnątrz pomieszczeń może zostać opanowane przez rozmaite uczulające mikrogrzyby strzępkowe, potocznie nazywane pleśniami, takie jak *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, a szczególnie *Alternaria spp.* [1]. Wśród grzybów strzępkowych ważnych w rolnictwie i budownictwie występują najczęściej rodzaje: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* [2]. Wykazano, że pleśnie *Alternaria spp.*, są znaczącą częścią mikrobiocenozy (14%–16% cząstek w powietrzu) w archiwach, muzeach, bibliotekach, kompostowniach roślin oraz garbarniach. [3]. Spory *Alternaria alternata* (dalej zamiennie Alt a lub *A. alternata*) stanowią dobrze znany biologiczny składnik zanieczyszczający oraz bardzo częste źródło aeroalergenów, jakie rozpoznajemy w próbkach środowiskowych [4]. Alt a jest głównie grzybem występującym w atmosferze "po zewnętrznej stronie drzwi", gdzie spory rozprzestrzeniają się w umiarkowanie ciepłym, suchym klimacie, osiągając szczyt opadu latem [5]. Chociaż najsilniejsze narażenie na Alt a dotyczy atmosfery, jednak może ona, wraz z innymi uczulającymi grzybami, kolonizować pomieszczenia, potęgując poziom ekspozycji [4]. Uczulenie na Alt a stanowi czynnikiem wyzwalający rozwój polisensytyzacji, dlatego, że oprócz Alt a 1, wytwarza szeroki i złożony zestaw alergenów krzyżowych, któ-

rych homologi występują w wielu innych źródłach [6]. (Tab. 1.) Szacuje się, że średnio około 6% ludzi jest uczulonych na grzyby strzępkowe [7].

Alternariozy

Mikrogrzyby strzępkowe, w tym głównie Alt a są powszechne w naturze. Niektóre z nich są saprofitami, inne patogenami upraw, roślin ozdobnych, owoców i warzyw i odpowiadają za niektóre, najbardziej niszczące choroby roślin. Mogą także powodować ubytki produktów rolnych w czasie przechowywania lub transportu [8]. Tzw., alternarioza powoduje poważne ubytki plonów ziemniaków i pomidorów oraz znaczące straty ekonomiczne [9]. Choroba jest wynikiem działania kwasu alternariowego, jednego z kilku metabolitów wtórnych (fitotoksyn) produkowanych przez grzyb [10]. Charakterystyczne dla alternariozy są czarne kropki lub plamy na powierzchniach zaatakowanych roślin [8]. Rodzaj *Alternaria* wytwarza ponad 70 fitotoksyn, które są szkodliwe dla roślin, a w części, jako tzw., mikotoksyny, także dla ludzi czy zwierząt [9]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost znaczenia alternariozy ziemniaków oraz wzrost powodowanych strat, który wynika m.in. ze zmiany klimatu w Europie: łagodne zimy i wilgotne, ciepłe lata umożliwiają przetrwanie źródeł infekcji oraz z mniejszego zakresu stosowania fungicydów zapobiegawczych

Słowa kluczowe:

mikrogrzyby,
mikotoksyny,
alternariozy,
komponenty
Alt a 1- Alt a 15 ,

Key words:

microfungi, mycotoxins,
alternarioses,
components,
Alt a 1-Alt a 15

lub wprowadzania fungicydów, które zawierają mniej substancji biologicznie czynnych zwalczających grzyby niedoskonałe np. mankozebu [10].

Mikotoksyny -zagrożenie zdrowotne

Mikotoksyny to szkodliwe związki organiczne o masie cząsteczkowej od 200 Da do 800 Da, wytwarzane przez grzyby strzępkowe należące do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* i innych. Mikotoksyny Alt a zostały wyizolowane z owoców (jabłko, gruszka, melon, morela, winogrona, rodzynki, truskawki, oliwki, owoce cytrusowe i suszone figi) z jarzyn (pomidor, pieprz, marchew, bulwy ziemniaka) jak również z różnych produktów spożywczych sporządzanych z surowca zanieczyszczonego pleśniami (gotowe soki, konfitury, sosy itp) [9]. Wśród szkodliwych dla człowieka mikotoksyn wytwarzanych przez *A. alternata* wymienia się: alternariol (AOH), jednometylowy eter alternariolu (AME), altenuen (ALT), altertoksyny I, II, III (ATX-I, II, III) oraz kwas L-teunazonikowy (TEA) [8].

Spektrum oddziaływania biologicznego mikotoksyn jest nader szerokie: genotoksyczne, mutagenne, teratogenne, rakotwórcze, estrogenne, cytotoksyczne (w tym neuro-, nefro-, hepato-, gastro-toksyczne) oraz immunosupresyjne i wiele innych niekorzystnych oddziaływań [2].

Zespół chorego budynku

Alt a może być także znajdowana w wilgotnych, niewystarczająco wentylowanych pomieszczeniach, w których jej alergizujące właściwości współtworzą tzw., zespół chorego budynku (*Sick-Building Syndrome-SBS*) [5]. Znany zespół SBS jest związany z wysokim stężeniem 13- b-glukanu w powietrzu oraz obecnością innych czynników biologicznie aktywnych, wytwarzanych przez pleśnie. Należy zwrócić uwagę, że *Alternaria sp* podobnie jak inne pleśnie stanowi potencjalne źródło β-D-glukanu (polimeru N-acetyl-β-D-glukozaminy, chityny). β-D-Glukan jest składnikiem ścian komórkowych grzybów, a jako silny aktywator systemu immunologicznego może powodować niealergiczne choroby kładu oddechowego [3].

- **Zespół Chorego Budynku obejmuje liczne objawy, takie jak katar, kaszel, objawy ze strony błon śluzowych oczu, nosa, gardła, bóle głowy, zaburzenia pamięci, snu, wysypki skórne, objawy podobne do astmy.**
- **Cechą charakterystyczną SBS jest fakt, iż objawy chorobowe zanikają, kiedy człowiek opuszcza na dłużej pomieszczenie, w którym dochodzi do ekspozycji na grzyby [4].**

Molekularna analiza alergenów *Alternaria alternata*

Pleśń Alt a jest silnie związana z występowaniem astmy, lecz znaczenie alergenów grzybów niedoskonałych pozostaje często niedoszacowane. Ponadto profil alergenów uwalnianych z tkanek Alt a jest mało zrozumiały [11]. Rozpoznanie uczulenia na *A. alternata* jest utrudnione z powodu różnorodności oraz złożoności dostępnych wyciągów alergenowych, a zatem zastosowanie pojedynczych oczyszczonych alergenów może znacznie uprościć procedury diagnostyczne [12]. Wyciągi uzyskane z tkanek i zarodników Alt a wciąż pozostają w użyciu, choć wiadomo, że są zmienne i niedostatecznie wystandaryzowane. Mogą zawierać różne mieszaniny alergenów oraz przypadkowych zanieczyszczeń. Współczesna biochemia i biologia molekularna stwarzają możliwości uzyskania czystych cząsteczek alergenów. Obecnie wyizolowano 16 białek uczulających Alt a, wiele z nich to enzymy [5], lecz oficjalnie zarejestrowano, jako alergeny, jedynie 11 z nich

[13]. Schematycznie zobrazowano je na rycinie 1, a poznane reakcje krzyżowe przedstawiono w Tabeli 1.

Alt a 1 Glikoproteina.

Stanowi alergen główny pleśni *A. alternata*. Masa cząsteczkowa 30 kDa Alergen główny Alt a 1 posiada unikalną strukturę beta-baryłkową, dimeryczną, po separacji ujawnia prążek 16,4 oraz 15,3 kDa w SDS PAGE, co sugeruje wiązanie disiarczkowe [3] [4]. Biologiczna funkcja alergenu Alt a 1 pozostaje wciąż nieznaną [5]. Największa ilość Alt a 1 powstaje po 4,5 tygodniach wzrostu i występuje głównie w pozostałości materiału użytego do hodowli. Jednocześnie aktywność wiążąca tIgE jest 15 razy większa w osadzie z hodowli niż we frakcjach antygenowych ekstrahowanych odpowiednimi buforami. Mikroskopia elektronowa potwierdza, że Alt a 1 uwalnia się zarówno ze spor jak i z tkanki mycelium [11]. Występowanie dodatnich testów dot-blot IgE dla Alt a 1 wynosiło 98% w badaniu Asturias JA i wsp. [12], co oznacza, że Alt a 1 może być używany, jako marker uczulenia na *A. alternaria*. Według Chruszcz i wsp. [14] około 80% pacjentów uczulonych na omawianą pleśń wytwarza sIgE przeciw Alt a 1. Alt a 1 oraz białka do niego homologiczne są charakterystyczne dla klasy *Dothideomycetes* należącej do workowców [14]. Wśród białek wywołujących alergię, opisanych w tym gatunku, alergen główny Alt a 1 uważany jest za zasadniczego sprawcę objawów powietrzno- pochodnych i postulowany, jako marker pierwotnego uczulenia na *A. alternata*. [6]. Immunoblotting oraz analiza inhibicji nie wykazały różnic w reakcji wiązania IgE pomiędzy naturalnym alergenem Alt a 1, a jego odtworzonym odpowiednikiem rAlt a 1 [12]. Domowe poziomye Alta a 1 podobnie jak Asp f 1 są zazwyczaj niskie, albo niewykrywalne. Natomiast wysokie stężenia bioaerolu występują w środowisku farm drobiu i tartaków [1]. (Tab. 1)

Alt a 3 białko szoku cieplnego

Masa cz. 70 kDa Alt a 3 jest chaperonem molekularnym [5]. Na alergen Alt a 3 wykazuje nadwrażliwość około 5% osób uczulonych na *A. alternata* [15]. Niedawne badania sugerują reklasyfikację białek szoku cieplnego (*heat shock protein-HSP*), w której alergen Alt a 3 odpowiada HSP 70 wraz z krzyżowo reagującymi białkami pleśni *C. herbarum* (Cla h 4) oraz pędzłaka *P. citrinum* (Pen c 19). W klasyfikacji tej odróżniono białko HSP90 (np. Asp f 12 w pleśni *A. fumigatus*) oraz HSP 88 (jako Mala s 10) [16]. Białka szoku cieplnego nazywane są powszechnie „białkami stresu”. HSP określa się także mianem chaperonów, czyli białek opiekuńczych [17]. Białka HSP pełnią bardzo ważną funkcję w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Ich synteza indukowana jest także pod wpływem stanów patologicznych w organizmie. HSP70, a głównie HSP72, występuje w przebiegu wielu nowotworów, choroby Alzheimera czy w chorobach nerek [18]. Badania doświadczalne przyczyniły się do odkrycia, że immunizacja szczurów zrekombinowanym białkiem HSP60 uniemożliwiła indukcję choroby reumatycznej. [19]. (Tab. 1)

Alt a 4 disulfidoizomeraza białek

M. cz. 57kDa [2]. Izomerazy to jedna z sześciu głównych klas enzymów; które katalizują przekształcenia w obrębie jednej cząsteczki, prowadząc do powstania izomeru substratu [20]. Powstawanie, redukcja i reorganizacja wiązań disiarczkowych katalizowana jest przez izomerazę disiarczkową (PDI) PDI jest enzymem o aktywności oksydoreduktazy, przeprowadzającym reakcje redukcji przez tworzenie wolnych grup tiolowych oraz utleniania przez tworzenie mostków disiarczkowych w białkach substratowych [5]. PDI zidentyfikowano na powierzchni wielu



typów komórek, w tym śródblonka, wątroby, nowotworów, trzustki. Izomeraza disiarczkowa występuje też na powierzchni płytek krwi, gdzie odgrywa ważną rolę w procesach adhezji, agregacji i wydzielania [20]. Alt a 4 to odpowiednik Cla h 5 [5].

Alt a 5 Białko rybosomalne P2

Masa 11kDa [2]. Wg klasyfikacji Podkomitetu Nomenklatury Alergenów WHO/UIUS przestarzała nazwa brzmiała Alt a 6. Sześć spośród 43 surowic chorych uczulonych na *A. alternata*, czyli 14% reagowało z alergenem rAlt a 5 (w oryginalnym doniesieniu rAlt a 6) w badaniu immunoblot. W innym doniesieniu w grupie 98 uczulonych na *A. alternata* wykryto podobną reakcję w 8 % badanych. [21]. *Alternaria* i *Cladosporium*, mają wspólne 3 alergeny, w tym białko rybosomalne P2 [22]. (Tab. 1)

Alt a 6 enolaza

Masa cz.45-47 kDa, optimum pH=6,8. Enolaza jest enzymem z klasy liaz, katalizującym przedostatnią reakcję w glikolizie – przekształcenie fosfoglicerynianu do fosfoenolopirogronianu [2]. Wykazano wysoką termostabilność enzymu, pozwalającą na zachowanie 50% aktywności po jednogodzinnej inkubacji w 50°C [5]. Przestarzałe nazwy to Alt a 5, Alt a 11 [21] 2 spośród 7 chorych uczulonych na *A. alternaria*- ujawniało PTS (+) wobec Alta a 11 (uwaga – obecnie Alt a 6).W innej grupie surowice 23 chorych podobnie uczulonych w 22% wiązały oczyszczony alergen rAlt a 11 w badaniu immunoblot [21]. W kolejnym doniesieniu Alt a 6 oznaczone za pomocą testu IgE dot-blot (do identyfikacji kwasów nukleinowych w komórkach) wynosiło w grupie osób z alergią na *A. alternata* 15% [12]. Wg Gutarowskiej i wsp [2] u 43% osób atopowych białko to wywołuje reakcję alergiczną. Licznie występują reakcje krzyżowe z innymi, np. enolazami, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*. [2]. Enolaza to także enzym odpowiedzialny za możliwe krzyżowe reakcje grzybów

z lateksem. Porównanie enolazy Hev b 9 z enolazą grzybów Alt a i Cla h wykazało identyczność sekwencji w odpowiednio 62% i 60%, na tyle można spodziewać się reaktywności krzyżowej pomiędzy antygenami grzybów i lateksu [23] [5]. (Tab. 1)

Alt a 7 białko YCP4

M.cz. 22 kDa [2]. Regulator transkrypcji [5]. Alergenność: Wśród 98 uczulonych na *A. alternata* 7% wykazało w badaniu immunoblot wiązanie sIgE z Alt a 7 [13]. Rodzaje *Alternaria* i *Cladosporium*, mają wspólne białko YCP4 [22]. Białko Alt a 7 (YCP4) reaguje z białkiem YCP 4 *S. cerevisiae* oraz Cla h 6 *C. herbarum* [2].

Alt a 8 enzym dehydrogenaza mannitolowa

M.cz.29 kDa [5]. Alergenność dość wysoka, bowiem 41% surowic osób uczulonych na Alt a posiada sIgE wobec Alt a 8, co zostało zweryfikowane za pomocą PTS [21].

Alt a 10 (dehydrogenaza aldehydowa)

M.cz. 53 kDa jest znanym enzymem katalizującym utlenienie aldehydów [2]. W grupie 98 uczulonych na wyciąg *A. alternata* 2% reagowało z Alt a 10. [21]. Białko to krzyżowo reaguje z białkiem rybosomalnym P2 *A. alternata* (Alt a 6) oraz YCP4 drożdży *S. cerevisiae*. *A. alternata* i *C. herbarum*, mają wspólny alergen: dehydrogenazę aldehydową [22].

Alt a 12 kwaśne białko rybosomalne P1

Masa cząsteczkowa 11 kDa [2]. Alt a 12 zawiera strukturę dużej jednostki rybosomalnej i pośredniczy w translacji [5]. (Tab. 1)

Alt a 13 i Alt a 14

Alergen Alt a 13 jest enzymem S-transferazą glutationową (M.cz. 26) [24]. Alt a14 (enzym dysmutaza podtlenkowa zawie-

1 TABELA Reakcje krzyżowe

<i>Curvularia lunata</i>	<i>Ulocladium botrytis</i>	<i>Stemphylium botryosum</i>	Alt a 1 Glikoproteina	
Pen c 19 <i>P. citrinum</i>	Asp f 12 <i>A. fumigatus</i>	Cla h 4 <i>C. herbarum</i>	Alt a 3 Białko szoku termicznego 70	Mala s 10 <i>M. sympodialis</i>
	Asp f 11	Cla h 5 <i>C. herbarum</i>	Alt a 4 Izomeraza	
Fus c 1 <i>F. culmorum</i> ()	Asp f 8 <i>A. fumigatus</i>	Cla h 5 <i>C. herbarum</i>	Alt a 5 Białko rybosomalne P2	
Cur l 3 <i>C. lunata</i> , Pen c 22 <i>P. citrinum</i>	Asp f 22 <i>A. fumigatus</i>	Cla h 6 <i>C. herbarum</i>	Alt a 6 Enolaza	Hev b 9 lateksu
	YCP4 <i>S.cerevisiae</i>	Cla h YCP4 <i>C. herbarum</i>	Alt a 7 Białko YCP4	
			Alt a 8 Dehydrogenaza mannitolowa	
		Cla h 10 <i>C. herbarum</i>	Alt a 10 Dehydrogenaza aldehydowa	Ole e 9 Oliwki
	Pen b 26 <i>P. brevicompactum</i>	Cla h 12 <i>C. herbarum</i>	Alt a 12 Kwaśne białko rybosomalne P1	
	Asp f 6 <i>A. fumigatus</i>		Alt a 14 MnSOD	Hev b 10 lateksu
			Alt a 15 Proteaza serynowa	

rająca mangan- MnSOD) M, cz. 24 kDa Wykazuje reakcję krzyżową ze swym homologiem w lateksie (Hev b10) [5].

Alt a 15 proteaza serynowa

Masa cz. 58 kDa. Alergenność: Analizy immunoblottingu 59 pacjentów z alergią na *A. alternata* wykazały, że u 15 z nich, czyli 10,2%, IgE wiąże nowo wykryty komponent rAlt 15. U wszystkich chorych z obecnością rAlt a 15 wykryto jednocześnie polisensytyzację wobec *A. alternata* i *C. lunata*. Opisana reaktywność krzyżowa była zależna od proteazy serynowej, co udowodniono metodą zahamowania immunoblottingu.

Opisany alergen Alt a 15 tłumaczy patogenezę choroby u osób z ujemnym oznaczeniem Alt a 1 lub niezgodny z kliniką wynik punktowych testów skórnych (PTS) z klasyczną mieszaniną alergenów Alt a, w której mogło nie być opisanego ostatnio białka [6].

Inne Alt a

W aktualnej bazie danych WHO/UIUS brak danych potwierdzających oficjalnie istnienie alergenów Alt a, takich jak Alt a 2, Alt a 70kDa, Alt a 9, Alt a 11; Alt a GST; Alt a NTF2, Alt a TCTP mimo ich obecności w niektórych doniesieniach [5] [4]. Przykładowo unikalny rekombinowany alergen rAlt a 2, o masie cząsteczkowej 25 kDa, został zidentyfikowany w roku 1999, jako alfa kinaza, ale bez żadnej homologii do ówczesnie znanych alergenów, Początkowo podawano, że rAlt a 2 został rozpoznany przez 61% surowic osób uczulonych na *A. alternata*, co oznaczałoby, że jest alergenem głównym [7]. Jednak w innej pracy częstość występowania Alt a 2 ustalona metodą testu IgE dot-blot wyniosła 0% [12]. Obecnie jest pomijany.

Epidemiologia alergii na pleśń *A. alternata*

Pierwsze w Polsce badania epidemiologiczne i środowiskowe nad rolą alergenów pleśni w astmie przeprowadził Bogdan Romański w Gdańsku w roku 1963. Ostatnio Niedoszytko i wsp. [25] wykazali wśród astmatyków w tym samym mieście dodatnie PTS wobec *Alternaria sp.* u 24%, natomiast w grupie kontrolnej osób bez astmy i alergii u 13%. Dane te były zbliżone do alergizacji wobec pierza. Badania przesiewowe dzieci z alergią w wieku 4 miesiące-18 lat, przyjętych do Kliniki Astmy i Alergii Dziecięcego Centrum Medycznego w Teheranie, wykazały, jako najczęstsze alergeny w PTS drzewa mieszane 26% oraz *A. alternata* 26% przed chwastami 23,6% oraz roztocznymi Df lub Dp- po 22,9% [26]. W innej, mniejszej grupie osób dorosłych z alergią całoroczną obecność sIgE na roztocza kurzu domowego nDer f 2 oraz kota rFel d 1 dotyczyła po 37,1%, a na alergen główny Alt a 1 – 35,7% [27].

Patogeneza alergii na pleśń *A. alternata*

Alt a może, po dostaniu się do nosa lub płuc osób nadwrażliwych, wywołać stan zapalny oraz objawy kliniczne nieżytu nosa, spojówek, a szczególnie astmy [6]. Ilość zarodników niezbędna do wywołania objawów chorobowych u większości osób z nadwrażliwością (tzw. wartość progowa) oceniona została na 100 zarodników w 1m³ powietrza dla rodzaju *Alternaria* [2].

Stwierdzono doświadczalnie u myszy uczulonych na trawę, że pojedyncze podanie wziewne wyciągu Alt a wzmacnia odpowiedź zapalną płuc typu 2, zwiększa eozynofilię płucną, nasila nacieki okołoskrzelowe i wytwarzanie śluzu indukowanego przez inhalację pyłku żyłcy.

Wyniki te sugerują, że w ciężkiej astmie występuje kombinacja natywnej i adaptacyjnej odpowiedzi (*innate and adaptive*

responses) na alergeny [28]. Gdyby to odnieść do ludzi, ekspozycje, zarówno z użyciem pyłku traw, jak pleśni Alt a mogą być potencjalną przyczyną astmy związanej z burzą z piorunami (*thunderstorm-related asthma*) [29]. Odnotowane przez kilka grup badaczy, opisane wyżej zjawisko wyzwała wrodzoną odpowiedź immunologiczną typu 2 u myszy, niezależnie od odporności nabytej [28].

Ostatnio odkryto, że szkodzą nie tylko zarodniki – przetrwalniki, ale też inne mikroskopijne fragmenty pleśni, które występują 500 razy częściej i docierają do płuc 250 razy łatwiej niż spory. Drobinę tę spotykamy w klimatyzowanych pomieszczeniach, samochodach i samolotach [20].

Osobliwości obrazu klinicznego alergii na pleśnie

Najczęściej alergizują cztery rodzaje: w powietrzu *Alternaria* i *Cladosporium* (Cla h), a w domach dodatkowo *Aspergillus* (Asp f) i *Penicillium* (Pen n) [11]. Dobrze znane specjalistom jest spostrzeżenie, że Alt a są często związane z reakcjami alergicznymi u uczulonych osób [9]. W porównaniu do innych pospolitych źródeł alergenów, takich jak pyłki i roztocza, grzyby strzępkowe są w praktyce alergologicznej niedoceniane i zaniebane [6]. Narażenie na pleśnie, szczególnie przy dużych stężeniach spor *A. alternata* w powietrzu, może wywołać wachlarz rozmaitych objawów chorobowych.

Anafilaksja

Chory z alergią wziewną IgE zależną na grzyby niedoskonałe (*A. alternata*, *C. herbarum*, *A. fumigatus*, *P. notatum*) oraz drożdże piekarnicze (*S. cerevisiae*), doznał wielokrotnie reakcji anafilaktycznej po spożyciu sosu grzybowego do makaronu, w którym znaleziono reagujące krzyżowo alergeny grzybów [30]. Opisano przypadek anafilaksji wysiłkowej po zapleśniałym ciastku z powszechnym alergenem pleśni- enolazą (Alt a 6), do tego wspólnym z alergenem lateksu (Hev b 9) [23]. Poza tym opisano przebytą anafilaksję na mykoproteiny *F. venenatum* zawarte w burgerze, u młodej kobiety uczulonej na spory Alt a. Inne badania ujawniły determinanty wspólne z Cla h oraz Alt a [31].

Zespół *Alternaria*-szpinak [32]

W ostatnich latach opisano zespół, w którym za kluczowy uznano komponent Alt a 1 [33]. W anafilaksji na szpinak i towarzyszącej alergii na grzyby sugerowano, jako przyczynę, wspólne epitopy. Dalsze badania wykazały reagujące krzyżowo białko o masie 30 kDa, prawdopodobnie Alt a 1, obecne zarówno w szpinaku jak i wyciągu pleśni [34].

Astma oskrzelowa

Badania nad wyzwalanymi przez pleśń *Alternaria* alergiami dróg oddechowych mają długą historię. Po raz pierwszy zostały opublikowane już w roku 1698, a kolejna data to 1817. Jednak dopiero w 1930 roku ustalono, że Alta a powoduje astmę atopową [5]. Alt a jest jednym najczęstszych na świecie saprofitów, epidemiologicznie kojarzonych z ciężką astmą [4]. Badania Niedoszytko i wsp. [25] na pacjentach z astmą wykazały pozytywną reakcję na alergeny tych grzybów, co najmniej dwukrotnie częstszą niż w grupach porównawczych, a zarazem związaną z cięższym przebiegiem astmy, w tym z opornością na leczenie [25]. Wielu autorów potwierdza, że uczulenie na *A. alternata* stanowi czynnik ryzyka wystąpienia świstów oraz astmy [35].

Uważa się, że Alt a stanowi przyczynę ciężkich, niebezpiecznych ataków astmy. Jednak dopiero dokładniej-



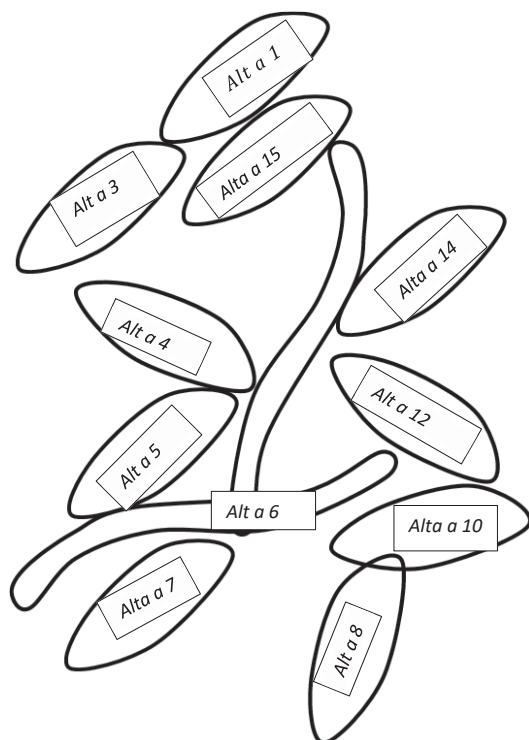
sze badania alergenów Alt a, jako czynnika rozwoju ciężkiej astmy, mogą wyjaśnić, dlaczego ta właśnie pleśń ma szczególne właściwości astmogenne i stanowi czynnik ryzyka rozwoju astmy ciężkiej [6].

W 33 szpitalach Hiszpanii, co dziesiąty chory z astmą miał alergię na *A. alternata*. Chorzy ci byli zazwyczaj młodszy, mieli liczne alergie towarzyszące, słabszą odpowiedź na leki rozszerzające oskrzela oraz dużo więcej poważnych komplikacji neurologicznych [36].

1

RVC.

Schemat alergenów *Alternaria alternata*



Alergiczny przewlekły nieżyt nosa i spojówek

Opisywano zawodowe uczulenie u pracowników produkujących suchą, dojrzewającą kielbasę (sdk). Dobrze ilustruje problem przypadek chłopca 5 lat, który przeżył trzykrotnie epizod obrzęku warg, w tym po zjedzeniu 2 plasterków sdk. Inne incydenty wystąpiły po spożyciu sera typu camembert. U dziecka dominował przewlekły katar. W mieszkaniu wykryto pleśń w ścianie, w miejscu, gdzie chłopiec siadywał, aby grać wiele godzin w gry komputerowe. Stężenie spor pleśni obok jego biurka wynosiło 433, 550, oraz 811 dla (odpowiednio) Asp f, Pen n i Clad h. W innych pokojach wykryto zaledwie 20 i 30 kolonii Asp f i Pen n. Testy wykazały uczulenie na Pen n i sdk oraz IgE (+) na Alt a. Test wargowy: katar, obrzęk warg i powiek od Alt a. Hodowla kielbasy ujawniła szczepy *P. nalgiovensis* oraz *A. ochraceus* [37].

Choroby wymagające różnicowania

W przeciwieństwie do pyłków, spory pleśni mogą powodować nie tylko alergie typu I, najczęstsze wśród chorób wywołanych przez grzyby niedoskonałe, lecz także szereg innych schorzeń. Wdychanie małych ilości spor pleśni może wyzwać odpowiedź IgE (alergię atopową) oraz astmę.

Masywne narażenie na niektóre pleśnie powoduje odpowiedź organizmu poprzez IgE oraz IgG, co objawia się aspergilozą oskrzelowo-płucną.

Nasilony kontakt z antygenami pleśni w kurzu organicznym może wywołać reakcje IgG i objawy alergicznego zewnątrzopłucznego zapalenia pęcherzyków płucnych [24Jahnc]. Wśród 43 chorych z astmą/nieżytem nosa posiadających miano CAP powyżej 2, wysoki odsetek, bo 93%, ujawniło przeciwciała zarówno klasy IgE jak IgG, co zdaniem autorów podkreśla ważność alergenu Alt a 1 [35]. Trzeba przypomnieć, że gryby mogą powodować nie tylko alergie, ale rozmaite grzybicę. Wspomniany kropidlak (Asp f) wywołuje, na szczęście dość rzadko, alergiczną aspergilozę oskrzelowo-płucną [15]. Opisano ekspresję białka D surfaktantu w odpowiedzi na alergeny *Aspergillus* w zapaleniu zatok przynosowych. [38]. Wśród dalszych chorób wymagających różnicowania z astmą wywołaną przez *Alternaria sp.*, wymienia się alergiczne grzybicze zapalenie zatok przynosowych, alergiczne grzybicze zapalenie oskrzelowo-płucne (nie tylko aspergillozę), zapalenie płuc z nadwrażliwości oraz atopowe zapalenie skóry (AZS) Autor niniejszego przeglądu (KB) ze zrozumieniem cytuję opinię Simon-Nobbe i wsp. [39] o AZS, jako alergii nie tylko IgE zależnej, lecz niezupełnie zgadza się z lokowaniem AZS wśród chorób „wywołanych przez grzyby”. Jednocześnie 47% chorych z AZS ma wyniki CAP wobec Alt a 1 wyższe, niż 2, lecz niższe w porównaniu do astmatyków a zjawisko to czeka wciąż na wyjaśnienie [35]. Dalsze rozważania różnicowe przekraczają ramy niniejszego doniesienia.

Diagnostyka

Dla właściwej interpretacji wyniku prób ekspozycji konieczne jest zwykle dokładniejsze scharakteryzowanie środowiska życia badanego, na przykład poprzez pomiar ekspozycji wobec alergenów (stężenie i rodzaj spor pleśni w czasie zaostżeń). Okresy intensywnego pojawiania się spor Alt a manifestują się z zaskakującą precyzją, o ile skonfrontujemy je z liczbowymi wartościami opadu. Przedstawione elementy składają się w niepowtarzalny zestaw etiologiczny danego przypadku, a zatem punkt wyjścia do swoistej immunoterapii alergenem –SITA, bądź/ i ukierunkowanej na główny alergen eliminacji i niestety niedocenianej nawet w konsensusach edukacji przyczynowej. Podkreślić należy, że już tytuł „Światowej strategii rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy” wskazuje na kluczową rolę zapobiegania chorobie, w tym głównie unikania i usuwania alergenów oraz innych czynników ułatwiających ich penetrację. Alt a 1 stanowi dobry znacznik do kontrolowania optymalnych warunków hodowli *A. alternaria* przeznaczonych do użytku klinicznego [11]. Wzrost alergii wywołanych przez Alt a wymaga dalszych badań nad rolą tych grzybów oraz ich component we wzbudzeniu IgE- zależnych chorób układu oddechowego. Rzeczywiście ostatnie badania alergenów Alt a pozwoliły na ich lepszą identyfikację, a zarazem na zarysowanie nowych perspektyw w zakresie kategoryzacji uczulających pleśni, dynamiki ich występowania i diagnostyki alergii wywołanych przez grzyby [6]. Interesującą nową propozycją jest, oparty o nanotechnologię, test IgE- Multiplex FABER, w którym możemy oznaczyć zarówno alergen główny Alt a 1, jak i enolazę Alt a 6.

Profilaktyka

W wielu przypadkach astmy czy kataru, których faktycznym sprawcą są pleśnie, chory powinien ograniczyć prace w ogrodzie, rozrzucanie obornika, grabienie liści

i resztek trawy, a zwłaszcza omijać z dala pryzmę kompostu. Należy unikać pomieszczeń, w których widoczne są plamy pleśni na ścianach, w łazienkach, wokół okien, zwłaszcza, gdy kupuje się nowy lokal. Wiele nowo zbudowanych „apartamentów” ma wadliwą wentylację, co sprzyja zagrzybieniu. Warto śledzić komunikaty w mediach, kiedy występują duże stężenia spor pleśni, a dzieje się tak w tym samym czasie, kiedy pyłą trawy i chwasty. Jak chodzi o pokarmy chorey powinien wystrzegać się spożycia mocno dojrzałego arbuza (może zawierać Alt a), oraz wszelkich potraw przeterminowanych lub z widoczną pleśnią (winogrona, truskawki, dzemy itp.) [9]. W mieszkaniu należy zadbać o doniczki z kwiatami i akwaria- częste źródło pleśni. Niebezpieczne dla alergików pleśniowych są także nawilżacze powietrza, zwłaszcza źle konserwowane.

Leczenie

Leczenie objawowe astmy i innych alergii wywołanych pleśniami nie odbiega od aktualnych wersji zaleceń GINA czy ARIA. Kluczowa pozostaje immunoterapia. Standaryzacja ekstraktów pleśni nastęrcza jednak wiele trudności wytwórcom szczepionek alergicznych. Już w 1999 r. opublikowano wyniki oznaczeń zawartości alergenu głównego Alt a 1 za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Zawartość Alt a 1 w badanych próbkach wynosiła od 0,01 do 6,09 mg/ml (śr. 1,4 – 1,6), Ekstrakty tego samego wytwórcy z dwóch kolejnych lat różniły się 2-4-krotnie. W przypadku jednej firmy nie stwierdzono w ogóle obecności alergenu. Problem rozwiąże dopiero dostępność alergików rekombinowanych i zestawów przeciwciał monoklonalnych, które wszyscy wytwórcy będą mogli wykorzystać do standaryzacji ekstraktów [21].

Pracę nadesłano
2016.11.29
Zaakceptowano
do druku 2016.11.30

Konflikt interesów nie występuje.

Piśmiennictwo: 1. Prester L. Indoor Exposure to Mould Allergens. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011; 62 (4):371-380. 2. Gutarowska B. Gryzby strzępkowe zasiedlające materiały budowlane wzrost oraz produkcja mikotoksyn i alergenu. *Zeszyty naukowe PŁ Łódź*, 2010, 1074. 3. Skóra J, Otlewska A, Gutarowska B et al. Production of the Allergenic Protein Alt a 1 by *Alternaria* Isolates from Working Environments. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12 (2): 2164-2183. 4. Gabriel MF, Postigo I, Gutiérrez-Rodríguez A, et al. Alt a 15 is a new cross-reactive minor allergen of *Alternaria alternata*. *Immunobiology*. 2016 Feb;221 (2):153-60. 5. Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G i wsp. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014; 47 (3):354-65. 6. Gabriel MF, Postigo I, Tomaz CT et al. *Alternaria alternata* allergens: markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ Int*. 2016 Apr;89:90-71-80. 7. Bush RK, Sanchez H, Geisler D. Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a 2. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104 (3):665-671. 8. Ogórek R, Plaskowska K, Kalinowska K. Characteristics and taxonomy of *Alternaria* fungi. *Mikol Lek* 2011; 18 (3):150-155. 9. Pavon Moreno MA, Gonzalez Alonso I, Martin de Santos R et al. The importance of genus *Alternaria* in mycotoxins production and human diseases. *Nutr Hosp* 2012; 27 (6):1772-1781. 10. Osowski J., Alternarioza (sucha i brunatna plamistość liści ziemniaka) występowanie, objawy i zwalczanie. „Ziemiak Polski”. 2014, 24 (2), 16-23. 11. Ibarrola I, Suárez-Cervera M, Arilla MC et al. Production profile of the major allergen Alt a 1 in *Alternaria alternata* cultures. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;93 (6):589-93. 12. Asturias JA, Ibarrola I, Ferrer A et al. Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005, 115 (6):1210-7. 13. Cramer R, Zeller S, Glaser AS et al. Cross-reactivity among fungal allergens: a clinically relevant phenomenon? *Mycoses*. 2009, 52, 2, 99-106. 14. Chruszcz M, Chapman MD, Osinski T, et al. *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: a unique β -barrel protein dimer found exclusively in fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:241-7.e9. 15. Zawisza E.: Zapalenie alergiczne i niealergiczne wywołane kontaktem z grzybami. *Alergia*, 2007, 4, 16-20. 16. Bowyer P, Denning DW. Genomic analysis of allergen genes in *Aspergillus* spp.: the relevance of genomics to everyday research. *Med Mycol* 2007; 45 (1):17-26. 17. Cymerys J, Niemiałowski M. Białka szoku cieplnego- Molekularne Perpetuum Mobile. *Postępy Biologii Komórki* 2004, 31, 2, 332-339. 18. Marzec Ł, Zdrojewski Z, Bryl E, i wsp. Białko szoku termicznego 72 (Hsp72) w chorobach nerek. *Nefrologia i Dializoterapia Polska* 2007, 11, 2, 72-79. 19. Stawski K, Goc A. Roślinne czynniki szoku cieplnego Kosmos *Problemy nauk biologicznych*, 2012 61, 4 (297):625-634. 20. Ponomareczuk N., Sobierajska K., Świątkowska M. Rola izomeryzy diarszarkowej w aktywacji integrzyn. *Postępy Hig Med Dośw* (online), 2014; 68: 666-683. 21. Allergome.org (dostęp 25.11.2016). 22. Nizio- Mąsior J. Standaryzacja szczepionek zawierających alergeny grzybowo pleśniowych. *Alergologia Współczesna* 2002, 1 (10), 15-17. 23. Wagner, S., Breiteneder, H., Simon-Nobbe, B. et al. Hev b 9, an enolase and a new crossreactive allergen from hevea latex and molds. Purification, characterization, cloning and expression. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 7006-7014. 24. Jahnz- Różyk K.: Wprowadzenie do alergii na antygeny grzybowo pleśniowych. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 2008, XXIV, Supl. 1, 7, 7 – 10. 25. Niedoszytko M., Chelmińska M., Gruchala-Niedoszytko M. i wsp.: Znaczenie zakażeń grzybiczych i alergii na grzyby u chorych na astmę oskrzelową. *Alergia, Astma, Immunologia*. 2006; 11: 49-55. 26. Hossaini S, Shoormasti RS, Akramian R et al. Skin Prick Test Reactivity to Common Aero and Food Allergens among Children with Allergy. *Iran J Med Sci*. 2014; 39 (1):29-35. 27. Rossi RE, Melioli G, Monasterolo G. Sensitization profiles in polysensitized patients from a restricted geographical area: further lessons from multiplexed component resolved diagnosis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2011; 43 (6):171-5. 28. Doherty TA, Khorram N, Chang JE et al. STAT6 regulates natural helper cell proliferation during lung inflammation initiated by *Alternaria*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303: 577-588. 29. Kim HK, Lund S, Baum R, et al. Innate type 2 response to *Alternaria* extract enhances ryegrass-induced lung inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163 (2):92-105. 30. Airola K, Petman L, Mäkinen-Kiljunen S. Clustered sensitivity to fungi: anaphylactic reactions caused by ingestive allergy to yeasts. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;97:294-297. 31. Katona SJ, Kaminski ER. Sensitivity to Quorn mycoprotein (*Fusarium venenatum*) in a mould allergic patient. *J Clin Pathol*. 2002;55:876-877. 32. Popescu FD. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*. 2015;5 (2):31-50. 33. Melioli G, Spenser C, Reggiardo G et al. Allergenius, an expert system for the interpretation of allergen microarray results. *World Allergy Organ J*. 2014;7: 15. 34. Herrera-Mozo I, Ferrer B, Luis Rodríguez-Sánchez J et al. Description of a novel panallergen of cross-reactivity between moulds and foods. *Immunol Invest*. 2006;35:181-197. 35. Valies LD, Perzanowski MS, Wheatley LM et al. IgE and IgG antibody responses to recombinant Alt a 1 as a marker of sensitization to *Alternaria* in asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2001;31 (12):1891-5. 36. Plaza V, Serrano J, Picado C, et al. Clinical characteristics of the fatal and near-fatal asthma in *Alternaria alternata* sensitized patients. *Med Clin (Barc)*. 2003;29;121 (19):721-4. 37. Ooi EH, Wormald PJ, Carney AS. Surfactant protein d expression in chronic rhinosinusitis patients and immune responses in vitro to *Aspergillus* and *Alternaria* in a nasal explant model. *Laryngoscope*. 2007 ;117 (1):51-7. 38. Morisset M., Parisot L., Kanny G., Moneret- Vautrin DA. Food allergy to moulds : two cases observed after dry fermented sausage ingestion. *Allergy*. 2003;58,11, 1203-1204; 39. Simon-Nobbe B, Denk U, Poll V. The Spectrum of Fungal Allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145 (1): 58-86. **Adres autora:** NZOZ Centrum Alergologii, 90-553 Łódź, ul. M. Kopernika 67/69; www.alergologia.com.pl **Opis ryciny** Rycina 1. Schemat 12 znanych komponent (alergenów szczegółowych) *Alternaria alternata* wzorowany na mikroskopowym obrazie tego mikrogrzyba strzępkowego. Tabela 1. Zestawienie opisanych dotychczas reakcji krzyżowych z komponentami alergicznymi *Alternaria alternata*.

Piśmiennictwo ze str. 42: 1. Soriano JB, Davis KJ, Coleman B, Visick G, Mannino D, Pride NB. The proportional Venn diagram of obstructive lung disease: two approximations from the United States and the United Kingdom. *Chest*. 2003;124(2):474-81. 2. Wardlaw AJ, Silverman M, Siva R, Pavord ID, Green R. Multi-dimensional phenotyping: towards a new taxonomy for airway disease. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(10):1254-62. 3. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Pobrano z: www.ginasthma.org. 2016. 4. Hardin M, Silverman EK, Barr RG, Hansel NN, Schroeder JD, Make BJ, et al. The clinical features of the overlap between COPD and asthma. *Respir Res*. 2011;12:127. 5. Muller V, Galfly G, Orosz M, Kovats Z, Odler B, Selroos O, et al. Characteristics of reversible and nonreversible COPD and asthma and COPD overlap syndrome patients: an analysis of salbutamol Easyhaler data. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:93-101. 6. Kurashima K, Takaku Y, Ohta C, Takayanagi N, Yanagisawa T, Sugita Y. COPD assessment test and severity of airflow limitation in patients with asthma, COPD, and asthma-COPD overlap syndrome. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:479-87. 7. Suzuki T, Tada Y, Kawata N, Matsuura Y, Ikari J, Kasahara Y, et al. Clinical, physiological, and radiological features of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:947-54. 8. Zeki AA, Schivo M, Chan A, Albertson TE, Louie S. The Asthma-COPD Overlap Syndrome: A Common Clinical Problem in the Elderly. *J Allergy (Cairo)*. 2011;2011:861926. 9. Lindner K, Panaszek B, Machaj Z. Astma u osób starszych. *Pol Arch Med Wewn*. 2007;117(8):350-4. 10. Valente S, Pasciuto G, Bernabei R, Corbo GM. Do we need different treatments for very elderly COPD patients? *Respiration*. 2010;80(5):357-68. 11. Lee SY, Park HY, Kim EK, Lim SY, Rhee CK, Hwang YI, et al. Combination therapy of inhaled steroids and long-acting beta2-agonists in asthma-COPD overlap syndrome. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:2797-803. 12. Martinez FJ, Standiford C, Gay SE. Is it asthma or COPD? The answer determines proper therapy for chronic airflow obstruction. *Postgrad Med*. 2005;117(3):19-26. 13. Brzostek D, Kokot M. Asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome in Poland. Findings of an epidemiological study. *Postępy Dermatol Alergol*. 2014;31(6):372-9. 14. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2015. : http://www.goldcopd.org. 2015. 15. Gartlehner G, Hansen RA, Carson SS, Lohr KN. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in patients with COPD: a systematic review and meta-analysis of health outcomes. *Ann Fam Med*. 2006;4(3):253-62. 16. Jones PW, Willis LR, Burge PS, Calverley PM. Inhaled Steroids in Obstructive Lung Disease in Europe study I. Disease severity and the effect of fluticasone propionate on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Eur Respir J*. 2003;21(1):68-73. 17. Calverley P, Pauwels R, Vestbo J, Jones P, Pride N, Gulsvik A, et al. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9356):449-56. 18. Jones KM, Seniukovich A. Inhaled steroids and risk of pneumonia for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;3:CD010115. 19. Price D, West D, Brussels G, Gryffyd-Jones K, Jones R, Miravittles M, et al. Management of COPD in the UK primary-care setting: an analysis of real-life prescribing patterns. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:889-904. 20. Vestbo J, Vogelmeier C, Small M, Higgins V. Understanding the GOLD 2011 Strategy as applied to a real-world COPD population. *Respir Med*. 2014;108(5):729-36. 21. Hardin M, Cho M, McDonald ML, Beaty T, Ramsdell J, Bhatt S, et al. The clinical and genetic features of COPD-asthma overlap syndrome. *Eur Respir J*. 2014;44(2):341-50. 22. Nielsen M, Barnes CB, Ulrik JS. Clinical characteristics of the asthma-COPD overlap syndrome--a systematic review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1443-54. 23. Alshabanat A, Zafari Z, Albanyan O, Dairi M, FitzGerald JM. Asthma and COPD Overlap Syndrome (ACOS): A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136065. 24. Andersen H, Lampela P, Nevanlinna A, Saynajakangas O, Keistinen T. High hospital burden in overlap syndrome of asthma and COPD. *Clin Respir J*. 2013;7(4):342-6. 25. Chung WS, Lin CL, Kao CH. Comparison of acute respiratory events between asthma-COPD overlap syndrome and COPD patients: a population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(17):e755. 26. Caillaud D, Chanez P, Escamilla R, Burgel PR, Court-Fortune I, Nesme-Meyer P, et al. Asthma-COPD overlap syndrome (ACOS) vs 'pure' COPD: a distinct phenotype? *Allergy*. 2017;72(1):137-45. 27. Sanchis J, Gich I, Pedersen S, Aerosol Drug Management Improvement T. Systematic Review of Errors in Inhaler Use: Has Patient Technique Improved Over Time? *Chest*. 2016;150(2):394-406. 28. Miravittles M, Alcazar B, Alvarez JF, Bazus T, Calle M, Casanova C, et al. What pulmonologists think about the asthma-COPD overlap syndrome. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1321-30. 29. Lim HS, Choi SM, Lee J, Park YS, Lee SM, Yim JJ, et al. Responsiveness to inhaled corticosteroid treatment in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(6):652-7. 30. Kitaguchi Y, Komatsu Y, Fujimoto K, Hanaoka M, Kubo K. Sputum eosinophilia can predict responsiveness to inhaled corticosteroid treatment in patients with overlap syndrome of COPD and asthma. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012;7:283-9. 31. Prynziński M. Nowoczesna terapia inhalacyjna przy pomocy Easyhaler czesc 3. Satisfakcja chorych. *Alergia*. 2014;3:15-8. 32. Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax*. 2009;64(8):728-35.