

Wpływ kolonizacji skóry *Staphylococcus aureus* na stopień uczulenia dzieci chorych na atopowe zapalenie skóry

EDYTA MACHURA¹, KRYSZYNA KARCZEWSKA², BOŻENA FINDYSZ-WYŁĄG², BOGDAN MAZUR³, MAGDALENA LODWICH³

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach: ¹Katedra i Klinika Pediatrii w Zabrze, kierownik: prof. dr hab. med. A. Dyduch; ²Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny w Zabrze, dyrektor: lek. A. Drybański; ³Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii w Zabrze, kierownik: prof. dr hab. med. W. Król

Wpływ kolonizacji skóry *Staphylococcus aureus* na stopień uczulenia dzieci chorych na atopowe zapalenie skóry

Machura E.¹, Karczevska K.², Findysz-Wyłąg B.², Mazur B.³, Lodwich M.³

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach: ¹Katedra i Klinika Pediatrii w Zabrze, e-mail: machurae@poczta.fm; ²Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny w Zabrze; ³Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii w Zabrze

Kolonizacja skóry *Staphylococcus aureus* u chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS) wiąże się z nasileniem zmian wypryskowych. Nosicielstwo *S. aureus* w drogach oddechowych może zaostrzać przebieg alergicznego nieżytu nosa (ANN) oraz astmy.

Celem pracy była ocena kolonizacji nosogardła i skóry przez *S. aureus* u dzieci chorych na AZS i astmę oraz zbadanie wpływu kolonizacji skóry patogenem na stopień uczulenia.

Materiał i metody. Badanie bakteriologiczne przeprowadzono u 59 dzieci chorych na astmę oraz u 40 dzieci chorych na AZS oraz u 56 dzieci zdrowych. Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD25⁺ i CD4⁺CD25⁺ oceniano metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki. Obecność *S. aureus* stwierdzono u 97,5% dzieci chorych na AZS. Nosicielstwo w górnych drogach oddechowych było częstsze u dzieci chorych na alergię niż u dzieci zdrowych. U dzieci chorych na AZS odsetek limfocytów CD8⁺ był mniejszy, a liczba limfocytów CD4⁺ i CD4⁺CD25⁺ większa niż u zdrowych. Wartości całkowite IgE, sIgE (Der. pteronyssinus i Der. farinae) oraz reaktywność skóry w PTS były większe w przypadku AZS niż astmy. SCORAD korelował z odsetkiem eozynofili, całkowitym IgE i sIgE (roztocza, pyłki) oraz liczbą kolonii (cfu) *S. aureus* w zmianach skórnych oraz z wielkością PTS. Stopień ciężkości astmy wiązał się z IgE i FEV₁. Stopień uczulenia był skorelowany z wiekiem badanych, czasem trwania AZS i astmy, a u dzieci chorych na AZS dodatkowo z liczbą limfocytów CD3⁺, CD4⁺ oraz odsetkiem limfocytów CD4⁺ i CD25⁺ we krwi obwodowej.

Wnioski. Kolonizacja skóry *Staphylococcus aureus* u chorych na AZS wiąże się z nasileniem indeksu SCORAD, ze stopniem uczulenia i zaburzeniami równowagi limfocytów T we krwi obwodowej.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, atopowe zapalenie skóry, uczulenie

Pol. Merk. Lek., 2008, XXV, 145, 51

Influence of *Staphylococcus aureus* skin colonization on degree of sensitization in atopic dermatitis children

Machura E.¹, Karczevska K.², Findysz-Wyłąg B.², Mazur B.³, Lodwich M.³

Silesian Medical University in Katowice, Poland: ¹Chair and Department of Pediatrics in Zabrze, e-mail: machurae@poczta.fm; ²Public Clinical Hospital in Zabrze; ³Department of Microbiology and Immunology in Zabrze

Staphylococcus aureus skin colonization in atopic dermatitis (AD) patients exacerbates disease activity. Nasal and throat *S. aureus* carriage may be also implicated in the clinical course of allergic rhinitis and asthma.

The aim of the study was to evaluate the frequency of skin, nasal, throat *S. aureus* colonization in patients with AD and asthma and assess if presence of this bacteria on the skin may be related with degree of sensitization.

Material and methods. Swabs for microbiological analysis were taken from affected skin, anterior nares and throat from 40 children with AD, 59 children with asthma and 56 healthy controls. Following lymphocyte subsets: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ were measured using flow cytometry.

Results. Nasal and throat *S. aureus* colonization was more frequent in atopic children. *S. aureus* was found in the skin lesions in 97.5% examined children with AD. Percentage of CD8⁺ was decreased but the number of CD4⁺, and CD4⁺CD25⁺ cells was elevated compared with healthy. Total IgE and sIgE Der. pteronyssinus and Der. farinae as well SPT (Skin Prick Test) wheel size were higher in AD children compared to asthma. SCORAD was correlated with total and sIgE (mite, pollen) and number of *S. aureus* and increasing skin reactivity skin. The degree of sensitization was correlated with patient's age, duration of AD and asthma and number of CD3⁺, CD4⁺ and percentage of CD4⁺CD25⁺ only in AD patients. Severity of asthma was correlated with FEV₁ and total IgE.

Conclusions. *Staphylococcus aureus* skin colonization in AD children increases disease activity and degree of sensitization measured by SPT wheel size and results in imbalance of peripheral blood T cells.

Key words: *Staphylococcus aureus*, atopic dermatitis, sensitization

Pol. Merk. Lek., 2008, XXV, 145, 51

Staphylococcus aureus jest ciągle obecny w przedsiönku nosa lub w gardle u około 20-30% zdrowych ludzi. Kolonizuje również skórę, ale w mniejszym stopniu (5%) [6]. Z badań wynika, że nosicielstwa *S. aureus* w górnych drogach oddechowych jest częstsze w przypadku chorób alergicznych, zwłaszcza w alergicznym nieżycie nosa (ANN), a w atopowym zapaleniu skóry (AZS) dotyczy nawet ponad 60% pacjentów [11, 31]. Osoby chore na AZS są szczególnie podatne na wirusowe, bakteryjne i grzybicze infekcje skóry. Wśród nich szczególną rolę przypisuje się *S. aureus*, który kolonizuje skórę nawet w ponad 95% przypadków AZS [18]. Skłon-

ność do zakażeń gronkowcowych skóry w AZS wiąże się z defektem bariery naskórka, zwiększoną adhezją bakterii, upośledzonym ich eliminowaniem oraz zaburzeniami odporności wrodzonej i nabytej [6]. Nieprawidłowy skład lipidów warstwy rogowej, zmniejszenie sfingozyny, alkaliczne pH skóry, małe stężenie IgA w wydzielinie gruczołów potowych oraz niedobór peptydów antybakteryjnych – katelicydyny (LL-37) i β-defensyny (hBD)-2 i -3 oraz dermicydyny stwierdzone u chorych na AZS – sprzyjają kolonizacji skóry przez *S. aureus* oraz znacznie utrudniają jego wyeliminowanie [20, 28, 32]. Przyczyna mniejszej ekspresji peptydów antybakteryj-

nych nie jest jasna, ale prawdopodobnie ma związek z prze wagą w mikrośrodku cytokin typu Th2. Wykazano, że IL-4 i IL-13, dominujące w ostrej fazie wyprysku, zdolne są do powstrzymywania indukowanej TNF- α i INF- γ syntezy hBD-2 i hBD-3 w keratynocytach [28]. W porównaniu z AZS niewiele jest badań oceniających związek innych chorób alergicznych z *S. aureus*. Niemniej jednak wyniki dotychczas prowadzonych badań wskazują na potencjalną rolę *S. aureus* w zaostrzaniu alergicznego nieżyty nosa (ANN) [4, 31] i astmy [3, 15, 17] oraz na związek z polipami nosa [5].

Celem pracy była ocena stopnia kolonizacji nosogardła oraz skóry przez *S. aureus* u dzieci chorych na AZS i astmę oraz próba odpowiedzi na pytanie, czy stopień kolonizacji skóry tym patogenem może mieć związek ze stopniem uczulenia i odchyleniami od normy wybranych parametrów immunologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Badania zostały przeprowadzone w grupie 99 chorych leczonych w Poradni Alergologiczno-Pulmonologicznej Szpitala Klinicznego w Zabrze, w tym 40 chorych na AZS w wieku od 2,5 do 18 lat (średnia wieku 8,9 $\pm$ 0,78 lat) i 59 dzieci chorych na astmę alergiczną (atopową) w wieku od 2,6 do 17,8 lat (średnia wieku 8,99 $\pm$ 0,48 lat).

AZS rozpoznano według kryteriów *Hanifina i Rajki* [13]. Stopień ciężkości choroby oceniano metodą SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) [10]. U 9 dzieci rozpoznano AZS o łagodnym przebiegu (SCORAD poniżej 25 punktów), u 15 dzieci o przebiegu średnim (SCORAD – 25-50 punktów), a u 16 dzieci o ciężkim przebiegu (SCORAD powyżej 50 punktów).

Zgodnie z przyjętymi kryteriami GINA 2002 [36] astmę epizodyczną rozpoznano u 11 dzieci, astmę przewlekłą lekką u 26 dzieci, umiarkowaną u 18 dzieci oraz ciężką u 4 dzieci. Dokładną charakterystykę badanych przedstawiono w tabeli 1 i 2.

Grupę kontrolną stanowiło 56 zdrowych dzieci w wieku od 2,7 do 17 lat (średnia wieku 8,43 $\pm$ 0,55 lat), u których na

Tabela 1. Charakterystyka dzieci chorych na AZS
Table 1. Characteristics of the children with AD

Liczba badanych	40
Wiek [lata]	8,9 $\pm$ 0,78
Płeć (dziewczynki/chłopcy)	24/16
Długość trwania AZS [lata]	8,11 $\pm$ 0,79
SCORAD	40 $\pm$ 3,6
<i>Staphylococcus aureus</i> (występowanie)	
nos	14 (35%)
gardło	16 (40%)
skóra	36 (97,5%)
FEV ₁	93 $\pm$ 2,1
FVC	90 $\pm$ 2,3
FEV ₁ %FVC	91 $\pm$ 5,2
PEF	81 $\pm$ 2,8
Punktowe testy skórne	
<i>Der. pteronyssinus</i>	25 (62,5%)
<i>Der. farinae</i>	28 (70%)
<i>A. siro</i>	16 (40%)
Trawy	30 (75%)
Drzewa	23 (57%)
Chwasty	21 (52,5%)
Zboża	12 (30%)
<i>Alternaria</i>	4 (10%)
<i>Cladosporium</i>	4 (10%)
<i>Aspergillus</i>	6 (15%)
Kot	17 (42,5%)
Pies	6 (15%)
Pióra	5 (12,5%)
Mleko	7 (17,5%)
Jaja	8 (20%)
Ryby	5 (12,5%)
Orzechy	9 (22,5%)

Tabela 2. Charakterystyka dzieci chorych na astmę
Table 2. Characteristics of the children with asthma

Liczba badanych	59
Wiek [lata]	8,99 $\pm$ 0,48
Płeć (dziewczynki/chłopcy)	17/42
Długość trwania astmy [lata]	5,46 $\pm$ 0,54
<i>Staphylococcus aureus</i> (występowanie)	
nos	22 (37,2%)
gardło	15 (25,4%)
skóra	0
FEV ₁	84,3 $\pm$ 2,06
FVC	83,3 $\pm$ 1,95
FEV ₁ %FVC	87,47 $\pm$ 1,63
PEF	76,04 $\pm$ 2,25
Punktowe testy skórne	
<i>Der. pteronyssinus</i>	50 (84%)
<i>Der. farinae</i>	53 (89%)
<i>A. siro</i>	18 (30%)
Trawy	28 (47,4%)
Drzewa	15 (25,4%)
Chwasty	17 (28,8%)
Zboża	8 (13,5%)
<i>Alternaria</i>	12 (20%)
<i>Cladosporium</i>	6 (10,1%)
<i>Aspergillus</i>	3 (5,0%)
Kot	14 (23,7%)
Pies	2 (3,3%)
Pióra	6 (10,1%)

podstawie wywiadu rodzinnego i osobniczego nie stwierdzono chorób atopowych, a stężenie IgE było prawidłowe (średnia 28,2 $\pm$ 2,23). Ponadto uzyskano w tej grupie ujemne wyniki PTS z alergenami pyłków, roztoczy, pleśni i alergenów pokarmowych, a w surowicy nie występowały sIgE.

Całkowite stężenie IgE oraz specyficzne IgE (sIgE) oznaczono metodą ELISA z użyciem zestawu testowego Allergopharma.

Punktowe testy skórne (PTS) zostały wykonane i ocenione zgodnie ze stanowiskiem EAACI. Za dodatnie wyniki testów skórnych przyjęto wielkość średnicy bąbla $\geq$ 3 mm, przy ujemnej kontroli negatywnej. U wszystkich dzieci wykonano te testy metodą *prick* z użyciem pospolitych alergenów wziewnych: alergenów roztoczy (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*), grzybów pleśniowych (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*), pyłków roślin (trawy, drzewa, chwasty, zboża), alergenów zwierząt (sierść kota, sierść psa, pióra) oraz alergenów pokarmowych (mleko, białka, jaja, mąka, mięso, ryby, orzechy). Stosowano wyciągi alergenowe firmy Allergopharma.

Do oceny subpopulacji limfocytów krwi obwodowej zastosowano metodę znakowania pełnej krwi z następczą lizą krwinek czerwonych. Pełną krew żylną inkubowano przez 30 min z odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromami: izotiocyaninem fluoresceiny (FITC), fikoerytryną (PE) oraz PerCP-em, a następnie przez 10 min z płynem lizującym FACSLysis (Becton Dickinson) w celu usunięcia erytrocytów. Po dwukrotnym przepłukaniu w buforze PBS znakowane komórki wprowadzono do cytofluorometru przepływowego (Becton Dickinson), rejestrując 10 tysięcy komórek w każdej próbce. Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina komórek z mieszaniną odpowiedniej klasy mysich immunoglobulin Ig1(FITC)+Ig2(PE)+IgG2a (PerCP). Do znakowania badanych komórek zastosowano przeciwciała monoklonalne: anty-CD3 (FITC, PE), CD4 (FITC, PE, PerCP), CD8 (FITC, PE, PerCP) i CD25 (FITC). Do kalibracji cytometru, czyli ustawienia parametrów FSC (rozproszenie promienia biegnącego wprost) i SSC (rozproszenie boczne), użyto kalibratora CaliBRITE™3 (Becton Dickinson). Analizę uzyskanych parametrów morfologicznych i fluorescencji przeprowadzono z użyciem programu Cell Quest.

Próbki do badań bakteriologicznych zmian skórnych pobierano z trzech okolic ciała. W tym celu sterylny cylinder

umieszczano na powierzchni skóry, następnie wlewano do niego 2 ml sterylnego 0,9% NaCl i pocierano powierzchnię skóry za pomocą szklanej bagietki, po czym wlewano popłuczyny do jałowej strzykawki, którą dostarczano bezpośrednio do pracowni bakteriologicznej. Eż kalibrowaną o pojemności 1 µl wysiewano płyn na podłoża na następujących płytkach: Columbia Agar + 5% krew barania (podłoże namnażające), Macconkey Agar (podłoże wybiórczo-różnicujące dla pałeczek G-), Mannitol Salt Agar (podłoże różnicujące dla gronkowców), Sabouraud Agar + chloramphenikol + gentamycyna (podłoże wybiórcze dla drożdżaków i grzybów drożdżopodobnych) oraz D-Coccosel Agar (podłoże wybiórcze dla enterokoków). Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych oceniano liczbę kolonii. Wyniki przedstawiono jako liczbę kolonii (cfu) przypadającą na 1 cm². W celu identyfikacji gronkowców wykonywano test na obecność katalazy za pomocą testu SLIDEX STAPH plus-BioMerieux (na obecność CF). Z użyciem analizatora mikrobiologicznego ATB EXPRESSION – paskiem ID 32 STAPH potwierdzano wyniki testów oraz wykonywano antybiogram, stosując pasek ATB STAPH 5 BioMerieux. U wszystkich dzieci pobierano wymazy z gardła i z nosa za pomocą sterylnych wymazówek i wysiewano na wymienione podłoża agarowe.

Do analizy statystycznej wyników badań wykorzystano program Statistica w wersji 3.3. W obliczeniach statystycznych przyjęto poziom istotności $p = 0,05$. Istotność różnic wartości średnich dla zmiennych o rozkładach odbiegających od rozkładu normalnego sprawdzano testem nieparametrycznym U-Manna-Whitneya i odpowiednio dla więcej niż dwóch populacji testem Kruskala-Wallisa. Korelację wybranych parametrów przeprowadzono za pomocą testu korelacji rang Spearmana.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

WYNIKI

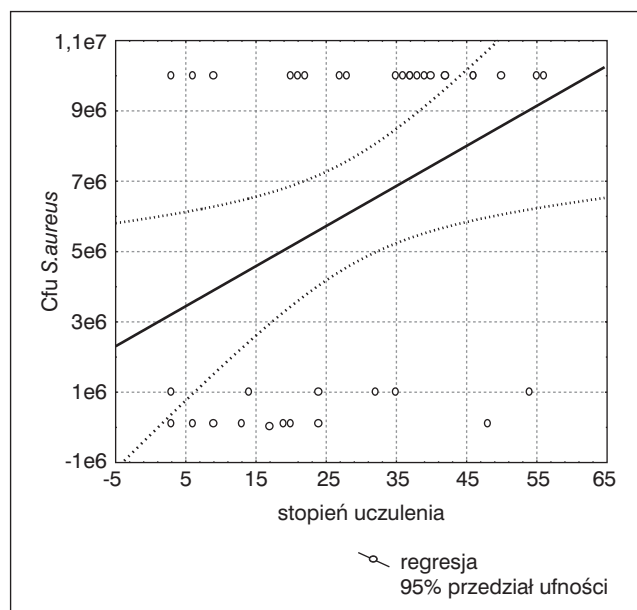
Nie stwierdzono różnic pod względem wieku między dziećmi chorymi na AZS lub astmę oraz dziećmi zdrowymi ($p = 0,7$). Nosicielstwo *S. aureus* w gardle było częstsze w przypadku AZS (nos – 35%, gardło – 40%) niż astmy (nos – 37,2%, gardło – 25,4%). W grupie kontrolnej nosicielstwo *S. aureus* było rzadsze niż w grupie badanej (nos – 19,6%, gardło – 26,7%). Obecność tego patogenu w skórze stwierdzono wyłącznie u dzieci chorych na AZS (97,5%).

Punktowe testy skórne, IgE całkowite, eozynofilia

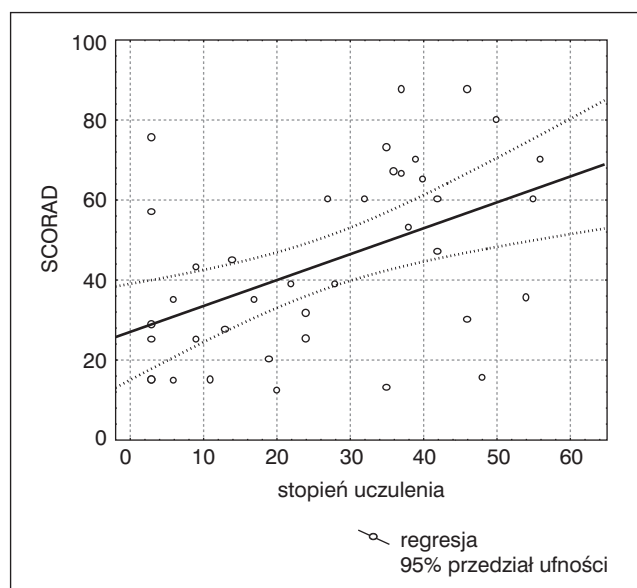
U dzieci chorych na astmę najczęściej stwierdzano dodatnie wyniki PTS z alergenami roztoczy (*D. pter.* i *D. far.*), następnie z alergenami pyłków traw. Z kolei u dzieci chorych na AZS najczęściej obserwowano dodatnie wyniki PTS z alergenami pyłków traw, następnie z alergenami *D. pter.* i *D. far.* oraz alergenami kota (tab. 3). Aby ocenić stopień uczulenia, zsumowano wielkość wszystkich odczynów PTS na badane alergeny i uzyskany wynik wyrażony w milimetrach porównano między grupami. Wykazano, że stopień uczulenia był istotnie większy u dzieci chorych na AZS (średnia wielkość bąbla $26,3 \pm 4,15$ mm) niż u dzieci chorych na astmę (średnia wielkość bąbla $16,7 \pm 3,6$ mm) – $p = 0,0006$. Co więcej, u dzieci

chorych na AZS z objawami astmy obserwowano większy stopień uczulenia niż u dzieci wyłącznie ze zmianami skórnymi (AZS+ astma = $37,8 \pm 14,1$; AZS = $21,96 \pm 5,6$; $p = 0,004$). Stopień uczulenia był skorelowany z wiekiem badanych dzieci oraz z czasem trwania AZS i astmy. Wyłącznie u dzieci chorych na AZS stopień uczulenia korelował ze stopniem ciężkości choroby określonym według skali SCORAD, z liczbą kolonii *S. aureus* w zmianach skórnych (ryc. 1 i 2), jak również z liczbą limfocytów CD3⁺ i CD4⁺, odsetkiem CD4⁺CD25⁺ oraz z wielkością bąbla w PTS dla alergenu roztoczy (*D. pter.* i *D. far.*).

U dzieci chorych na AZS i u dzieci chorych na astmę wartość eozynofili (odsetek i liczba bezwzględna) oraz całkowite stężenie IgE były istotnie większe w porównaniu z dziećmi zdrowymi (GK) (tab. 4). Liczba bezwzględna eozynofili oraz stężenie IgE były większe w przypadku AZS niż astmy (odpowiednio $p = 0,002$ i $p = 0,001$).



Ryc. 1. Korelacja liczby *S. aureus* ze stopniem uczulenia ($r = 0,39$, $p = 0,01$)
Fig. 1. Correlation between number of *S. aureus* and degree of sensitization ($r = 0,39$, $p = 0,01$)



Ryc. 2. Korelacja stopnia ciężkości AZS (SCORAD) ze stopniem uczulenia ($r = 0,48$, $p = 0,01$)
Fig. 2. Correlation between severity of AD and degree of sensitization ($r = 0,48$, $p = 0,01$)

Tabela 3. Wartości średnie $\pm$ SE eozynofili i IgE w badanych grupach
Table 3. Mean value $\pm$ SE of eosinophils and IgE in examined groups

Parametr	AZS	Astma	Grupa kontrolna
Eozynofile [%]	$8,73 \pm 1,14$	$7,29 \pm 0,79$	$2,24 \pm 1,18^*$
Eozynofile [liczba]	$305,20 \pm 6,15^{***}$	$260,43 \pm 10,44$	$137,35 \pm 6,18^{**}$
IgE [IU/ml]	$719,95 \pm 154,81^{****}$	$312,84 \pm 30,11$	$28,2 \pm 2,23^{*****}$

*AZS i astma vs. GK, $p = 0,00002$; **AZS i astma vs. GK, $p = 0,00002$;
*** AZS vs. astma, $p = 0,02$; **** AZS vs. GK, $p = 0,00002$, astma vs. GK, $p = 0,009$; ***** AZS vs. astma, $p = 0,001$.

Tabela 4. Wartości średnie $\pm$ SE sIgE w AZS i astmie
Table 4. Mean value $\pm$ SE of sIgE in AD and asthma

Grupa	Parametr	n [%]	Średnia $\pm$ SE [IU/ml]
AZS	sIgE <i>D. pter.</i>	25 (62,5%)	27,20 $\pm$ 6,74
	sIgE <i>D. far.</i>	13 (32,5%)	30,07 $\pm$ 9,43
	sIgE trawy	23 (57,5%)	15,08 $\pm$ 3,92
	sIgE drzewa	10 (25%)	12,86 $\pm$ 7,76
	sIgE chwasty	8 (20%)	2,31 $\pm$ 1,11
	sIgE kot	4 (10%)	0,88 $\pm$ 0,22
	sIgE mleko	8 (20%)	7,32 $\pm$ 3,52
	sIgE jajo	5 (12,5%)	5,91 $\pm$ 3,11
	sIgE orzech	2 (5%)	2,0 $\pm$ 1,2
Asthma	sIgE <i>D. Pter.</i>	50 (84,7%)	13,09 $\pm$ 1,87
	sIgE <i>D. far.</i>	8 (13,5%)	16,34 $\pm$ 6,27
	sIgE trawy	21 (35,6%)	9,37 $\pm$ 3,38
	sIgE drzewa	10 (17%)	3,57 $\pm$ 0,93
	sIgE chwasty	6 (10,2%)	0,87 $\pm$ 0,43
	sIgE <i>Alternaria</i>	8 (13,5%)	6,56 $\pm$ 1,63

Porównanie wartości średnich sIgE między grupami wykazało, że dla większości alergenów sIgE było większe w AZS, ale jedynie w przypadku sIgE dla *D. pter.* różnice między AZS i astmą były istotnie statystycznie ($p = 0,01$).

Ocena subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej w badanych grupach

W tabeli 5 przedstawiono wartości odsetkowe i liczby bezwzględne limfocytów CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD25⁺ i CD4⁺CD25⁺. W AZS odsetek limfocytów CD8⁺ był istotnie mniejszy, a liczba limfocytów CD4⁺ była istotnie większa niż w grupie dzieci zdrowych (odpowiednio $p = 0,008$; $p = 0,03$). Odsetek limfocytów CD4⁺ był istotnie większy w przypadku AZS niż astmy ($p = 0,04$). Liczba limfocytów CD4⁺CD25⁺ była większa u dzieci chorych na AZS niż u dzieci zdrowych ($p = 0,01$). W porównaniu z dziećmi chorymi na astmę zarówno odsetek, jak i liczba limfocytów CD4⁺CD25⁺ w AZS były istotnie większe (odpowiednio $p = 0,002$; $p = 0,02$). Nie stwierdzono różnicy między dziećmi chorymi na astmę a dziećmi zdrowymi w odniesieniu do badanych populacji limfocytów krwi obwodowej.

Tabela 5. Odsetek i liczby bezwzględne badanych subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej w badanych grupach
Table 5. Percentage and absolute number of the lymphocyte subsets in examined groups

Limfocyty	AZS	Asthma	Grupa kontrolna (GK)
CD3 ⁺ [%]	67,03 $\pm$ 0,96	64,64 $\pm$ 0,95	66,84 $\pm$ 0,89
CD3 ⁺ liczba	2156,94 $\pm$ 175,16	1989,25 $\pm$ 96,8	1768,27 $\pm$ 68,14
CD4 ⁺ [%]	40,75 $\pm$ 1,15*	36,85 $\pm$ 0,91	38,91 $\pm$ 0,99
CD4 ⁺ liczba	1287,41 $\pm$ 93,96**	1130,24 $\pm$ 50,0	1028,95 $\pm$ 46,85
CD8 ⁺ [%]	23,28 $\pm$ 0,85***	26,47 $\pm$ 0,87	27,39 $\pm$ 0,83
CD8 ⁺ [liczba]	758,61 $\pm$ 84,22	803,06 $\pm$ 41,5	720,13 $\pm$ 31,53
CD3 ⁺ CD25 [%]	5,28 $\pm$ 0,42	5,98 $\pm$ 0,76	7,27 $\pm$ 0,44
CD3 ⁺ CD25 ⁺ [liczba]	158,55 $\pm$ 15,14	196,53 $\pm$ 33,5	196,82 $\pm$ 16,04
CD4 ⁺ CD25 [%]	4,90 $\pm$ 0,26****	3,88 $\pm$ 0,14	4,54 $\pm$ 0,44
CD4 ⁺ CD25 ⁺ [liczba]	148,02 $\pm$ 9,80*****	119,32 $\pm$ 6,74	110,10 $\pm$ 12,52

*AZS vs. astma, $p = 0,04$; **AZS vs. GK, $p = 0,03$; ***AZS vs. GK, $p = 0,008$; ****AZS vs. astma, $p = 0,002$; *****AZS vs. GK, $p = 0,01$, AZS vs. astma, $p = 0,02$

Korelacja stopnia klinicznego AZS i astmy z ocenianymi parametrami immunologicznymi

Stopień ciężkości AZS oceniany metodą SCORAD był skorelowany z odsetkiem eozynofili ($r = 0,31$; $p = 0,047$), cał-

Tabela 6. Zależność między stopniem uczulenia (suma wielkości bąbli w PTS w mm) u dzieci chorych na AZS a ocenianymi parametrami
Table 6. Relation between degree of sensitization (summative wheal sizes of PTS – mm) in AD children and examined parameters

Parametr	Współczynnik korelacji r Spearmana	Poziom p
AZS		
Wiek i stopień uczulenia	0,56	0,004
Lata choroby i stopień uczulenia	0,59	0,002
Liczba CD3 ⁺ i stopień uczulenia	0,53	0,01
Liczba CD4 ⁺ i stopień uczulenia	0,54	0,008
CD4 ⁺ CD25 ⁺ [%] i stopień uczulenia	0,36	0,02
Liczba bakterii <i>S. aureus</i> (cfu) i stopień uczulenia	0,39	0,01
Stopień uczulenia i SCORAD	0,48	0,01
PTS <i>D. pter.</i> i stopień uczulenia	0,58	0,001
PTS <i>D. far.</i> i stopień uczulenia	0,59	0,001
ASTMA		
Wiek i stopień uczulenia	0,36	0,03
Lata choroby i stopień uczulenia	0,4	0,015

kowitym stężeniem IgE ($r = 0,51$; $p = 0,005$), stopniem uczulenia ($r = 0,48$; $p = 0,01$), sIgE *D. pter.* ($r = 0,69$; $p = 0,008$), sIgE *D. far.* ($r = 0,56$; $p = 0,003$), sIgE drzewa ($r = 0,68$; $p = 0,029$), sIgE chwasty ($r = 0,78$; $p = 0,021$) oraz liczbą kolonii *S. aureus* ($r = 0,6$; $p = 0,00009$). Stopień ciężkości astmy korelował dodatnio z całkowitym IgE ($r = 0,4$; $p = 0,001$), a ujemnie ze wskaźnikiem FEV₁ ($r = -0,71$; $p = 0,0001$).

Korelacja eozynofili z ocenianymi parametrami immunologicznymi

U dzieci chorych na AZS odsetek eozynofili był skorelowany z odsetkiem limfocytów CD8⁺ ($r = 0,37$; $p = 0,046$), a u chorych na astmę z odsetkiem i liczbą limfocytów CD3⁺CD25⁺ (odpowiednio $r = 0,47$; $p = 0,028$; $r = 0,46$; $p = 0,003$) oraz z reaktywnością skóry w PTS dla alergenu *D. far.* ($r = 0,98$; $p = 0,01$).

OMÓWIENIE

W badaniach wykazano, że częstość nosicielstwa *S. aureus* w przedsionku nosa była podobna u dzieci chorych na AZS (35%) i chorych na astmę (37%), natomiast obecność gronkowca w gardle stwierdzano częściej w przypadku AZS (40%) niż w astmie (25,4%). Ogólnie natomiast nosicielstwo bakterii było częstsze w grupie badanej niż w grupie dzieci zdrowych (nos 19,6%, gardło 26,7%). Obecność *S. aureus* w skórze stwierdzono wyłącznie u dzieci chorych na AZS (97,5%).

Staphylococcus aureus jest źródłem prozapalnych białek, tj. alfa-toksyny i proteiny A, oraz ma receptory o dużym powinowactwie do białek macierzy pozakomórkowej – kolagenu (Cna-collagen-binding protein), fibrynogenu (CLF-clumping factor) i fibronektyny (Fnbp-fibronectin-binding protein). IL-4 i IL-13 obecne przede wszystkim w ostrej fazie wyprysku na skutek zwiększenia ekspresji fibronektyny i fibrynogenu wzmagają adhezję gronkowców do zmienionej zapalnie skóry [8].

Gronkowiec ten izolowany ze skóry chorych na AZS przynajmniej w 46-65% uwalnia superantygeny, takie jak: SEB A B C (*staphylococcal enterotoxin A, B, C*) i TSST-1 (toxic shock syndrome toxin) [35], które penetrując naskórek i skórę, wchodzi w interakcję z wieloma komórkami układu odpornościowego, prowadząc przede wszystkim do rozwoju zapalenia zależnego od limfocytów T [25, 27]. Proces zapalny w skórze jest zastrzany pod wpływem superantygenów z powodu poliklonalnej aktywacji limfocytów T oraz indukcji antygenowo-swoistych limfocytów T promujących syntezę sIgE dla

enterotoksyn [4, 26]. Efektem wpływu superantygenów na limfocyty T jest ich aktywacja, proliferacja i wzrost sekrecji cytokin, a także zwiększona ekspresja cząsteczki Fas, apoptoza lub anergia limfocytów [9, 16, 22, 24].

W 57-61% przypadków AZS stwierdza się obecność sIgE dla superantygenów gronkowców kolonizujących skórę [18, 27], które korelują z ciężkością choroby, całkowitym stężeniem IgE [23, 37] oraz sIgE dla alergenów [4, 37].

W pracy wykazano, że liczba kolonii *S. aureus* koreluje z nasileniem zmian skórnych, stopniem aktywacji limfocytów T, z całkowitym stężeniem IgE, a także ze stopniem uczulenia, który oceniono na podstawie reaktywności skóry w PTS. W grupie badanych dzieci chorych na AZS, jak również chorych na astmę stwierdzono istotnie większy odsetek i większą liczbę bezwzględną eozynofili oraz większe całkowite stężenie IgE w porównaniu z dziećmi zdrowymi. W AZS eozynofilia bezwzględna oraz całkowite stężenie IgE i sIgE dla alergenu roztoczy (*D. pter.*) było większe niż w astmie. Odsetek eozynofili w AZS był skorelowany z odsetkiem limfocytów CD8⁺. Z badań wynika, że limfocyty CD8⁺ z ekspresją CLA⁺ uwalniają więcej IL-5 i IL-13 niż osoby zdrowe, co może mieć związek z przedłużonym czasem przeżycia eozynofili w chorych na AZS [1]. Stopień ciężkości AZS i astmy w grupie badanych dzieci był skorelowany z całkowitym stężeniem IgE, co wykazano w wielu innych pracach [7, 21]. Całkowite IgE w AZS było również większe w odniesieniu do dzieci chorych na astmę. Warto dodać, że duże stężenie IgE może przyczyniać do zwiększonej wrażliwości na infekcje, ponieważ IgE powstrzymuje adhezję neutrofilów, fagocytozę i wybuch tlenowy, a to ostatecznie wpływa negatywnie na proces eliminowania bakterii ze skóry i sprzyja przewlekłej jej kolonizacji przez patogeny w AZS [2, 12].

Stopień ciężkości AZS oceniany metodą SCORAD był ponadto skorelowany ze stopniem uczulenia określonym na podstawie PTS oraz wartości stężenia sIgE dla alergenów wziewnych (roztocza i pyłki). Niekorzystny wpływ uczulenia na alergeny wziewne na przebieg AZS potwierdzają inni autorzy [29, 34]. Podobnie jak inni badacze, nie stwierdzono w pracy zależności między sIgE i reaktywnością skóry na alergeny w PTS a stopniem ciężkości astmy [7].

Niewykluczone, że większe stężenie IgE i sIgE w AZS niż w astmie ma związek z kolonizacją skóry przez *S. aureus*. Jest on bowiem źródłem superantygenów, które zwiększają syntezę IgE i sIgE [19]. W badaniach Lee i wsp. potwierdzono, że całkowite IgE i sIgE dla alergenów *D. pter.* i *D. far.* u chorych na alergię, u których równocześnie stwierdzono obecność sIgE dla SEA/SEB, jest większe niż u osób, u których nie wykazano „uczulenia” na enterotoksyny gronkowcowe [23]. W prowadzonych badaniach wykazano, że liczba kolonii *S. aureus* korelowała ze stopniem uczulenia, który oceniono na podstawie PTS. Stopień uczulenia natomiast był skorelowany z wiekiem badanych dzieci, jak też z czasem trwania AZS i astmy, a u dzieci chorych na AZS dodatkowo z liczbą limfocytów CD3⁺ i CD4⁺ oraz odsetkiem CD4⁺CD25⁺. Współistnienie objawów astmy u dzieci chorych na AZS łączyło się z większym stopniem uczulenia, ale warto dodać, że dzieci z objawami astmy były starsze, co mogło wpłynąć na uzyskany wynik.

Stwierdzono, że w przypadku AZS występują zaburzenia równowagi limfocytów pod postacią zmniejszenia odsetka limfocytów CD8⁺ oraz większej liczby limfocytów CD4⁺, jak i CD4⁺CD25⁺ niż u zdrowych. Wykazane różnice między AZS i astmą, takie jak: większy odsetek limfocytów CD4⁺ oraz większy odsetek i zwiększona liczba CD4⁺CD25⁺ mogą mieć również związek z kolonizacją skóry *S. aureus* i wskazują na odrębności w immunopatogenezie obu chorób.

Limfocyty CD4⁺CD25⁺ stanowią heterogenną populację komórek, wśród których, oprócz aktywnych limfocytów T, znajdują się tzw. naturalne limfocyty T regulatorowe (nTreg). Limfocyty nTreg (CD4⁺CD25⁺) ograniczają proliferację efektorowych limfocytów T oraz mają supresyjny wpływ na uwalnianie prozapalnych cytokin. Dlatego też uważa się, że za-

burzenia równowagi i funkcji limfocytów CD4⁺CD25⁺ mogą mieć istotny wpływ na przebieg chorób alergicznych [33]. Wyniki części badań sugerują istnienie defektu funkcji limfocytów CD4⁺CD25⁺ w chorobach alergicznych [33].

Ponieważ w prezentowanej pracy nie było możliwości odróżnienia limfocytów regulatorowych od aktywnych limfocytów, można jedynie założyć, że w obrębie limfocytów o fenotypie CD4⁺CD25⁺ obecne były również limfocyty nTreg. Ostatnio opublikowane wyniki badań potwierdzają, że odsetek limfocytów CD4⁺CD25⁺ jest większy u chorych na AZS niż u osób zdrowych, jednakże pod wpływem SEB limfocyty regulatorowe o fenotypie CD4⁺CD25⁺ izolowane z krwi chorych na AZS oraz osób zdrowych tracą właściwości supresyjne. Tak więc w przypadku kolonizacji skóry przez *S. aureus* wytwarzające superantygeny limfocyty Treg nie funkcjonują prawidłowo, w efekcie czego dochodzi do aktywacji limfocytów T i zwiększenia reakcji zapalnej [30].

Badania prowadzone z udziałem chorych oraz na modelu zwierzęcym, jak też *in vitro* w kulturach komórkowych wskazują na udział *S. aureus* w zaostrzaniu zapalenia alergicznego w drogach oddechowych [17]. U osób z objawami ANN, uczulonych na roztocza, stwierdzono, że obecność *S. aureus* w przedślonku nosa wiąże się z nasileniem objawów, większym stężeniem ECP i IgE oraz większym stosunkiem IL-13/INF- γ w płuczninach z nosa [31]. U chorych na ciężką astmę (FEV₁ < 75%) stwierdzono w BAL selektywną aktywację limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ z obecnością swoistego dla superantygenów gronkowcowych regionu V β (TCRV β 8*) – zarówno w porównaniu z chorymi na astmę lekką (FEV₁ > 80% w.n.), jak i zdrowymi, co sugeruje, że superantygeny mogą być potencjalnym czynnikiem wywołującym aktywację limfocytów T w astmie źle kontrolowanej [15].

U 25-33% pacjentów z objawami ANN oraz u 29,4-49% chorych na astmę wykazano obecność sIgE dla SEA i SEB, co koreluje z przebiegiem choroby oraz całkowitym i sIgE dla *D. pter.* [4, 23]. Superantygeny mogą powodować niewrażliwość na glikokortykosteroidy (GKS), na skutek czego dodatkowo mogą pogarszać przebieg AZS i astmy, w przypadku których miejscowa terapia GKS stanowi podstawę leczenia [14].

WNIOSKI

1. Nosicielstwo *S. aureus* w nosogardle u dzieci chorych na AZS i astmę jest częstsze niż u zdrowych.
2. Kolonizacja skóry *S. aureus* dotyczy większości dzieci chorych na AZS i przyczynia się do zaostrzenia zmian skórnych, a także nasila stopień uczulenia oraz może mieć związek z zaburzeniami równowagi limfocytów T krwi obwodowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Akdis M., Simon H.U., Weigl L. i wsp.: *Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8⁺ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis*. J. Immunol., 1999, 163, 466-475.
2. Al-Mohanna F., Parhar R., Kawaasi A. i wsp.: *Inhibition of neutrophil functions by human immunoglobulin E*. J. Allergy Clin. Immunol., 1993, 92, 757-766.
3. Bachert C., Gevaert P., Howarth P. i wsp.: *IgE to Staphylococcus aureus enterotoxins in serum is related to severity of asthma*. J. Allergy Clin. Immunol., 2003, 115, 1131-1132.
4. Bachert C., Gevaert P., van Cauwenberge P.: *Staphylococcus aureus enterotoxins; a key in airway disease?* Allergy, 2002, 57, 480-487.
5. Bachert C., van Zele T., Gevaert P. i wsp.: *Superantigens and nasal polyps*. Curr. Allergy Asthma Resp., 2003, 3, 523-531.
6. Baker B.S.: *The role of microorganisms in atopic dermatitis*. Clin. Exp. Immunol., 2006, 144, 1-9.
7. Carroll W.D., Lenney W., Child F. i wsp.: *Asthma severity and atopy: how clear is the relationship?* Arch. Dis. Child., 2006, 91, 405-409.
8. Cho S.H., Strickland I., Boguniewicz M., Leung D.Y.: *Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of Staphylococcus aureus to atopic skin*. J. Allergy Clin. Immunol., 2001, 108, 269-274.

9. Davison S., Allen M., Vaughan R. i wsp.: *Staphylococcal toxin-induced T cell proliferation in atopic eczema correlates with increased use of superantigen – reactive B beta chains in cutaneous lymphocyte – associated antigen (CLA)-positive lymphocyte*. Clin. Exp. Immunol., 2000, 121, 181-186.
10. European Task Force on Atopic Dermatitis. *Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index*. Dermatology, 1993, 186, 23-31.
11. Gilani S.J., Gonzalez M., Hussain I. i wsp.: *Staphylococcus aureus re-colonization in atopic dermatitis: beyond the skin*. Clin. Exp. Dermatol., 2005, 30, 10-13.
12. Guzik T.J., Bzowska M., Kasprzowicz A. i wsp.: *Persistent skin colonization with Staphylococcus aureus in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters*. Clin. Exp. Allergy, 2005, 35, 448-455.
13. Hanifin J.M., Rajka G.: *Diagnostic features of atopic dermatitis*. Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh), 1980, 92, 44-7.
14. Hauk P.J., Hamid Q.A., Chrousos G.P. i wsp.: *Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens*. J. Allergy Clin. Immunol., 2000, 105, 782-787.
15. Hauk P.J., Wenzel S.E., Trumble A.E. i wsp.: *Increased T cell receptor Vbeta8+ T cells in bronchoalveolar lavage fluid of subjects with poorly controlled asthma: a potential role for microbial superantigens*. J. Allergy Clin. Immunol., 1999, 104, 37-45.
16. Heaton T., Mallon D., Venaille T. i wsp.: *Staphylococcal enterotoxin induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease: the hygiene hypothesis in reverse*. Allergy, 2003, 58, 252-256.
17. Herz U., Ruckert R., Wollenhaupt K. i wsp.: *Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increases airway responsiveness – a model for non-allergic asthma*. Eur. J. Immunol., 1999, 29, 1021-1031.
18. Hoeger P. H.: *Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing S. aureus strains in children with atopic dermatitis*. Pediatr. Allergy Immunol., 2004, 15, 474-777.
19. Hofer M.F., Harbeck R.J., Schlievert P.M. i wsp.: *Staphylococcal toxin augment specific IgE responses by atopic patients exposed to allergen*. J. Invest. Dermatol., 1999, 112, 171-176.
20. Imayama S., Shimozone Y., Hoashi M. i wsp.: *Reduced secretion of IgA to skin surface of patients with atopic dermatitis*. J. Allergy Clin. Immunol., 1994, 94, 195-200.
21. Jahnz-Rozyk K., Targowski T., Paluchowska E. i wsp.: *Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis*. Allergy, 2005, 60, 685-688.
22. Kedzierska A., Kaszuba-Zwoinska J., Slodowska-Hajduk Z. i wsp.: *SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients – correlation to clinical status and skin colonization by Staphylococcus aureus*. Arch. Immunol. Ther. Exp., 2005, 53, 63-70.
23. Lee J.H., Lin Y.T., Yang Y.H. i wsp.: *Increased levels of serum specific immunoglobulin E to Staphylococcal enterotoxin A and B in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma*. Int. Arch. Allergy Immunol., 2005, 138, 305-311.
24. Lehmann H.S., Heaton T., Mallon D. i wsp.: *Staphylococcal enterotoxin B-mediated stimulation of interleukin-13 as a potential etiologic factor in eczema in infants*. Int. Arch. Allergy Immunol., 2004, 135, 306-312.
25. Leung D.Y.: *Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention*. J. Allergy Clin. Immunol., 2000, 105, 860-76.
26. Lin Y.T., Wang C.T., Hsu C.T. i wsp.: *Differential susceptibility to staphylococcal superantigen (SsAg) – induced apoptosis of CD4+ T cells from atopic dermatitis patients and healthy subjects: The inhibitory effect of IL-4 on SsAg-induced apoptosis*. J. Immunol., 2003, 171, 1102-1108.
27. Mrabet-Dahbi S., Breuer K., Klotz M. i wsp.: *Deficiency in immunoglobulin G2 antibody against staphylococcal enterotoxin C1 defines a subgroup of patients with atopic dermatitis*. Clin. Exp. Allergy, 2005, 35, 274-281.
28. Nomura I., Goleva E., Howell M.D. i wsp.: *Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes*. J. Immunol., 2003, 171, 3262-3269.
29. Novak N., Bieber T., Leung D.Y.: *Immune mechanisms leading to atopic dermatitis*. J. Allergy Clin. Immunol., 2003, 112, 128-139.
30. Ou L.S., Goleva E., Hall C. i wsp.: *T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens*. J. Allergy Clin. Immunol., 2004, 11, 756-763.
31. Riechelmann H., Essig A., Deutschle T. i wsp.: *Nasal carriage of Staphylococcus aureus in house dust mite allergic patients and healthy controls*. Allergy, 2005, 60, 1418-1423.
32. Roll A., Cozzio A., Fischer B., Schmid-Grendelmeier P.: *Microbial colonization and atopic dermatitis*. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 2004, 4, 373-378.
33. Romagnani S.: *Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders?* Allergy, 2006, 61, 3-14.
34. Schafer T., Heinrich J., Wjst M. i wsp.: *Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in school children*. J. Allergy Clin. Immunol., 1999, 104, 1280-1284.
35. Strickland I., Hauk P.J., Trumble A.E. i wsp.: *Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in atopic dermatitis*. J. Invest. Dermatol., 1999, 112, 249-253.
36. Światowa strategia rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy. Raport NHLBI/WHO. Med. Prakt.(wydanie specjalne), 2002, 6, 1-181.
37. Tomi N.S., Kranke B., Aberer E.: *Staphylococcal toxin in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects*. J. Am. Acad. Dermatol., 2005, 53, 67-72.

Otrzymano 23 sierpnia 2007 r.

Adres: Edyta Machura, Katedra i Klinika Pediatrii, 41-800 Zabrze, ul. 3 Maja 13/15, tel. 0 32 271 87 01, e-mail: machurae@poczta.fm

Podstawy endokrynologii praktycznej

29.09–03.10.2008 r.

Warszawa

Charakter kursu: Kurs doskonalący dla lekarzy specjalizujących się w endokrynologii, chorobach wewnętrznych, medycynie rodzinnej, pediatrii oraz położnictwie i ginekologii.

Organizator: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Studium Kliniczno-Dydaktyczne, Zakład Neuroendokrynologii Klinicznej, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99

Kierownik naukowy: prof. dr hab. med. Bogusława Baranowska

Zgłoszenia na kurs: Wyłącznie na formularzu zgłoszenia na kursy w ramach programu dydaktycznego CMKP. Studium Kliniczno-Dydaktyczne; 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99, tel.: 0 22 569 38 05, faks: 0 22 569 38 09, e-mail: kursy-3@cmkp.edu.pl

Płatność: kurs bezpłatny