

**Agnieszka Zeidler**

**Ocena odpowiedzi cytokinowej  
u osób dorosłych z przewlekłymi zakażeniami  
*Staphylococcus aureus***

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. med. Andrzej Szkaradkiewicz

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej  
UM im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Poznań 2012

**Niniejsza praca była częściowo finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego  
w Warszawie (Grant nr N N401 004637)**

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy

Panu

**Prof. dr hab. med. Andrzejowi Szkaradkiewiczowi**

Kierownikowi Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za życzliwość, opiekę merytoryczną i wszechstronną pomoc w realizacji tej pracy

Pragnę podziękować

**Panu dr Tomaszowi Karpińskiemu**

z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej

UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za pomoc w zakresie przeprowadzenia badań molekularnych

**Koleżankom i Kolegom**

Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

dziękuję

za wsparcie i życzliwość w trakcie realizacji niniejszej pracy

## Spis treści:

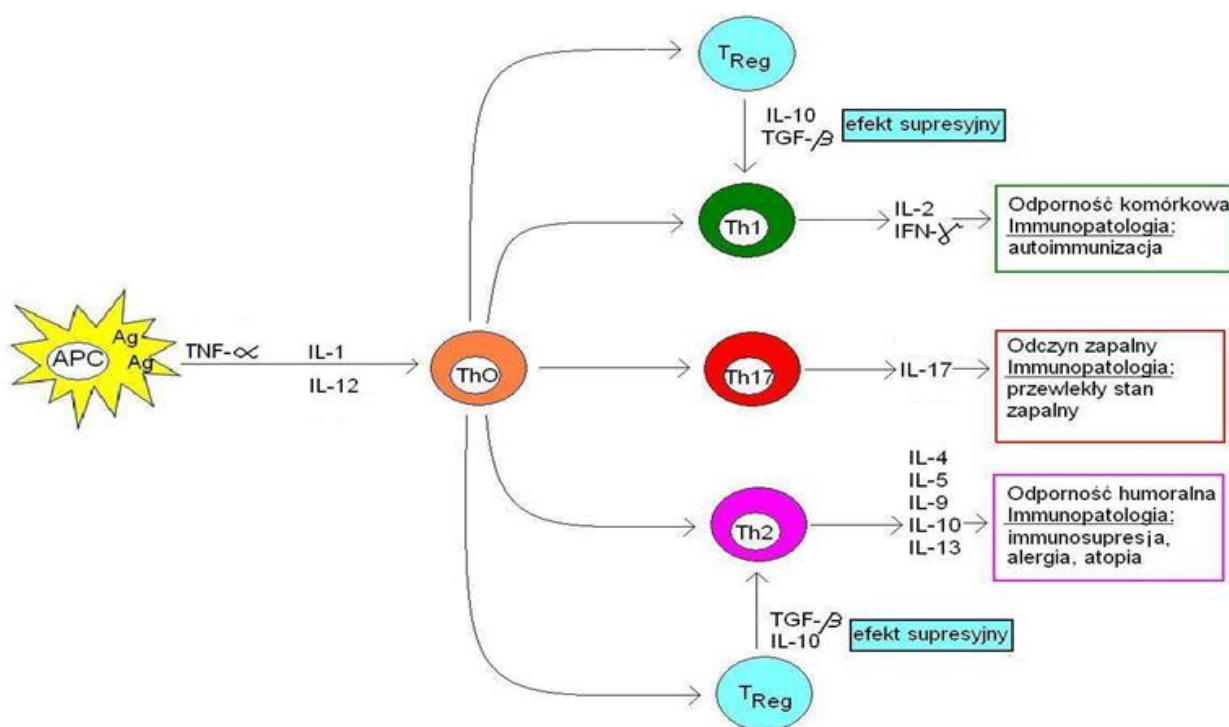
I.	WSTĘP.....	6
1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.1.1.	Charakterystyka <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.1.2.	Chorobotwórczość <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.1.3.	Diagnostyka zakażeń <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
1.2.	Charakterystyka systemu globalnej regulacji genów <i>agr</i> (accessory gene regulator).....	16
1.3.	Charakterystyka badanych cytokin .....	17
II.	CELE PRACY .....	21
III.	MATERIAŁY I METODY BADAŃ.....	22
3.1.	Badania kliniczne .....	22
3.2.	Przygotowanie materiału do badań mikrobiologicznych .....	22
3.3.	Badania mikrobiologiczne i immunologiczne.....	23
3.3.1.	Hodowla bakterii <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
3.3.2.	Oznaczanie lekowrażliwości badanych szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
3.3.3.	Ekstrakcja DNA .....	25
3.3.3.1.	Wykrywanie genu <i>mecA</i> .....	26
3.3.3.2.	Wykrywanie grup specyficzności <i>agr</i> .....	27
3.3.4.	Oznaczanie cytokin .....	28
3.3.4.1.	Oznaczanie surowiczego INF- $\gamma$ .....	28
3.3.4.2.	Oznaczanie surowiczej IL-4.....	28
3.3.4.3.	Oznaczanie surowiczej IL-10.....	28
3.3.4.4.	Oznaczanie surowiczej IL-17A.....	28
3.3.4.5.	Oznaczanie surowiczego TNF- $\alpha$ .....	28
3.3.4.6.	Oznaczanie surowiczej IL-1 $\beta$ .....	28
3.3.4.7.	Oznaczanie surowiczej IL-12.....	29
3.3.4.8.	Oznaczanie surowiczego TGF- $\beta$ 1 .....	29

3.4. Analiza statystyczna wyników .....	30
IV. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE .....	31
4.1 Analiza kliniczna badanych grup pacjentów .....	31
4.1.1. Ocena struktury badanej populacji .....	31
4.2. Ocena lekowrażliwości <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
4.3. Ocena występowania grup specyficzności agr u <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
4.4. Ocena surowicznych poziomów TGF- $\beta$ 1 .....	36
4.5. Ocena surowicznych poziomów cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17A) .....	36
4.6. Ocena surowicznych poziomów cytokin prozapalnych (monokin) wytwarzanych przez monocyty/makrofagi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12).....	37
V. DYSKUSJA .....	46
VI. WNIOSKI .....	52
VII. STRESZCZENIE.....	53
VIII. SUMMARY .....	56
IX. WYKAZ TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII .....	59
X. PIŚMIENNICTWO .....	62

## I. WSTĘP

Gronkowiec złocisty *S. aureus* należy do najczęstszych gatunków bakterii wywołujących zakażenia szpitalne i pozaszpitalne. Dobrze znana jest zdolność wywoływania pozaszpitalnych zakażeń przewlekłych przez *S. aureus*, najczęściej przewlekłych ropnych chorób skóry lub przewlekłych zapaleń górnych dróg oddechowych. Antybiotykoterapia tych stanów zapalnych jest często nieskuteczna, występują nawroty choroby, związane z przetrwałym zakażeniem *S. aureus*. Chorobotwórczość tego patogenu jest determinowana wytwarzaniem wielu czynników wirulencji, które podlegają kontroli u *S. aureus* przez system globalnej regulacji genów – *agr* (accessory gene regulator). Na podstawie polimorfizmu genów *agr* wyróżnia się 4 główne grupy specyficzności systemu *agr*: *agr* I, *agr* II, *agr* III, *agr* IV [40]. Jednocześnie bada się ich związek z typem choroby wywoływanej przez *S. aureus*.

Nadal brak jest danych w zakresie roli reakcji odpornościowej w patogenezie przewlekłych zakażeń gronkowcowych. Bardzo istotną rolę w przeciwdrobnoustrojowej reakcji odpornościowej spełnia odpowiedź cytokinowa limfocytów Th oraz monocytów/makrofagów.



Ryc. 1. Odpowiedź cytokinowa indukowana antygenami patogenów [22, 107].

## 1.1. *Staphylococcus aureus*

### 1.1.1. Charakterystyka *Staphylococcus aureus*

Gronkowce mają kształt kulisty, o średnicy 0,8-1 um. Są to ziarenkowce układające się (zwłaszcza w hodowli na podłożach stałych) w charakterystyczne, nieregularne skupienia przypominające winne grona — stąd nazwa gronkowce. W środowiskach naturalnych i w podłożach płynnych często występują pojedynczo, w postaci dwoinek, czworaczków lub krótkich łańcuszków. Barwią się Gram-dodatnio. Nie wytwarzają zarodników i nie wykazują ruchu; niektóre szczepy wytwarzają otoczki [35].

Gronkowce rosną na podłożach zwykłych w temperaturze 6,5-46°C przy pH 4,2-9,3. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 30 – 37°C, optymalne pH 7,0 – 7,5. Są względnie beztlenowcami, jednak lepiej rosną w warunkach tlenowych. W bulionie tworzą jednolite zmętnienie i osad na dnie. Na agarze w ciągu 24h powstają kolonie o średnicy 1-3 mm, okrągłe, wypukłe, gładkie, błyszczące, wilgotne, zwykle zabarwione na kolor złocisty, pomarańczowy lub żółty. Zabarwienie nie zawsze występuje, czasami kolonie są białe. Wytwarzanie barwnika zależy od składu podłoża i warunków hodowli [50].

Gronkowce (zwłaszcza szczepy chorobotwórcze) cechuje wysoka aktywność biochemiczna dzięki wytwarzanym przez nie enzymom. Na agarze z krwią niektóre szczepy wywołują hemolizę beta. Wykazują dużą odporność na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych. Rosną w podłożach z dodatkiem 40% żółci i 15% NaCl.

Są wytrzymałe na wysychanie; mogą przeżyć wiele tygodni poza ustrojem, zwłaszcza w obecności białka, np. w wyschniętej ropie na pościeli, w kurzu i w innych miejscach, do których nie dochodzą promienie słoneczne [50].

Po raz pierwszy gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) został wykryty przez Pasteura w 1880 roku w materiale ropnym, a wyhodowany z czystej hodowli oraz bliżej opisany jako gronkowiec ropny przez Rosenbacha w 1884 roku, a także jako *Micrococcus pemphigi neonatorum* przez Winternitza w 1889 roku [114].

Spośród ponad 40 gatunków wchodzących w skład rodzaju *Staphylococcus*, za najważniejszy uznawany jest *Staphylococcus aureus*. Gatunek ten powoduje częste infekcje bakteryjne zarówno ludzi jak i zwierząt [35].

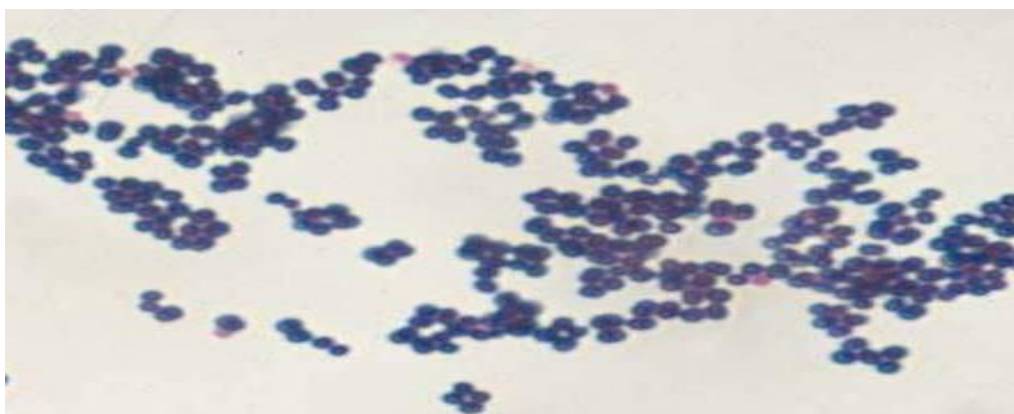


*S. aureus* jest oportunistycznym patogenem, którego podstawowym rezerwuarem u człowieka jest skóra i błony śluzowe. Powszechne nosicielstwo sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się drobnoustroju w środowisku. Około 20% ludzi jest stałymi nosicielami tego gatunku, a od 30% do 50% może być nosicielami przejściowymi [70, 35]. Jeśli zaistnieją czynniki sprzyjające zakażeniu, takie jak obniżenie odporności immunologicznej, przerwanie barier ochronnych organizmu np. oparzenia oraz występowanie innych schorzeń, może stać się jednym z najbardziej groźnych chorobotwórczych patogenów [34].

*Staphylococcus aureus* jest od wielu lat jednym z podstawowych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i pozaszpitalne u ludzi.

Do czynników wirulencji *S. aureus* należą liczne enzymy takie jak: hialuronidaza depolimeryzująca kwas hialuronowy znajdujący się w przestrzeni komórkowej i tym samym ułatwiająca inwazję, lipaza, deoksyrybonukleaza, koagulaza, fibrynolizyna, która powoduje rozpuszczenie włókniaka oraz toksyny:  $\alpha$  - hemolizyna,  $\beta$  - hemolizyna,  $\gamma$  - hemolizyna,  $\lambda$  - hemolizyna, leukocydyna, leukocydyna Panton - Valentine (PVL) powodują efekt cytolityczny i martwicę tkanek [55].

Znaczną rolę w patogenezie *S. aureus* odgrywają superantygeny, które stanowią grupę egzotoksyn. Należą tu enterotoksyny, eksfoliatyny oraz TSST – (toxic shock syndrome toxin - 1) [28, 81]. Superantygeny mają zdolność pobudzania znacznej liczby limfocytów należących do wielu różnych klonów. Nienaturalna aktywacja tak wielu komórek T może stać się toksyczna, ponieważ prowadzi do produkcji i uwalniania nadmiernej ilości cytokin. Nadmiernie pobudzone do proliferacji przez superantygeny limfocyty T wchodzą w stan anergii lub apoptozy [33].



**Fot. 1.** *Staphylococcus aureus* preparat barwiony metodą Grama.

Wśród czynników warunkujących inwazyjność *S. aureus* występują także białka powierzchniowe pełniące ważną rolę w adhezji do komórek gospodarza. *S. aureus* wytwarza również proteiny wiążące się z białkami i komórkami krwi (białko A, clumping factor CF), co sprzyja blokowaniu odpowiedzi immunologicznej oraz odgrywa ważną rolę w inicjacji i / lub nasileniu zapalenia [38, 99].

### **1.1.2. Chorobotwórczość *Staphylococcus aureus***

Częstość występowania, nasilenie i czas trwania infekcji gronkowcowych rosną za sprawą nosicielstwa gronkowców (głównie na śluzówkach nosa) wśród pacjentów i personelu medycznego. Drobnoustroje rozprzestrzeniają się głównie drogą kropelkową, rzadziej przez zakażone powietrze, kurz i przedmioty [113].

Gronkowce złociste są czynnikiem etiologicznym wielu schorzeń. Zakażenia dotyczą przede wszystkim skóry i tkanek podskórnych, zwykle z udziałem procesu ropnego [5] (czyraki, trądzik, jęczmień, liszajec zakaźny, zastrzał, róża, *cellulitis*, zapalenie mieszków włosowych, gronkowcowy zespół oparzonej skóry) oraz zakażenia ran pooperacyjnych. Gronkowce te mogą wywoływać także zakażenia układowe i narządowe np. zakażenia układu oddechowego, w tym zapalenie płuc, zapalenie oskrzeli, opłucnej, płuc, ucha środkowego, zatok obocznych nosa, gardła i migdałków, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, ropnie mózgu, zapalenie szpiku kostnego i kości, zakażenia układu moczowego, zapalenie mięśnia sercowego oraz zakażenia lub zatrucia związane z wytwarzaniem przez te bakterie określonych toksyn: zespół wstrząsu toksycznego, zespół oparzonej skóry. U osób z obniżoną odpornością, u pacjentów leczonych z powodu innych chorób, a także po zabiegach chirurgicznych zakażenie gronkowcowe może przejść w postać uogólnionej posocznicy [17, 29]. Gronkowcowe zatrucia pokarmowe, których źródłem są produkty żywnościowe zanieczyszczone szczepami enterotoksycznymi charakteryzują się krótkim okresem wylęgania (od 1 do 5 godzin). Zanieczyszczenia mogą mieć charakter pierwotny, np. mięso zwierząt z gronkowcowym uogólnionym procesem ropnym lub mleko zwierząt chorych na gronkowcowe zapalenie wymienia. Najczęściej jednak dochodzi do wtórnego zakażenia produktów żywnościowych od ludzi chorych z zakażeniami ropnymi skóry lub od nosicieli gronkowców zatrudnionych w przemyśle spożywczym. Gronkowcowe zatrucia pokarmowe często występują w formie epidemii.

*S. aureus* jest zdolny do łatwego nabywania oporności na antybiotyki. Cecha ta jest kodowana chromosomalnie lub wiąże się z obecnością w komórce plazmidu niosącego geny oporności. Obecnie coraz częściej obserwuje się występowanie szczepów wielolekoopornych, co utrudnia skuteczne leczenie infekcji gronkowcowych.

Wprowadzenie każdego nowego antybiotyku do leczenia zakażeń gronkowcowych jak dotąd zawsze po dłuższym lub krótszym czasie prowadziło do selekcji szczepów opornych. Już w niedługim czasie po zastosowaniu w leczeniu penicylin zaobserwowano występowanie szczepów opornych wytwarzających penicylinazę - enzym hydrolizujący penicyliny. Rozprzestrzenianie się tej oporności wśród szczepów jest bardzo szybkie ze względu na kodowanie jej przez geny plazmidowe. Dziś wiadomo, że ponad 90% szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych hospitalizowanych jest niewrażliwych na działanie penicylin naturalnych, aminopenicylin oraz ureidopenicylin. Wobec tych szczepów mogą być skuteczne cefalosporyny, penicyliny odporne na działanie  $\beta$ -laktamaz np. penicyliny izoksazolylowe, oraz połączenia penicylin z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz [34]. Są to szczepy wrażliwe na metycylinę – MSSA.

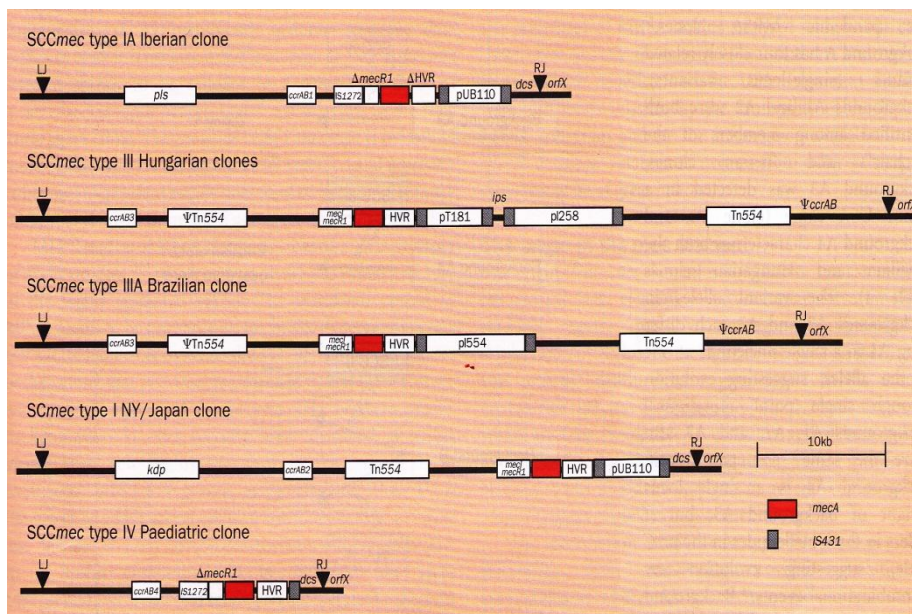
W 1961 roku wykryto po raz pierwszy gronkowce złociste odporne na metycylinę, tj. gronkowce MRSA charakteryzujące się opornością na wszystkie antybiotyki  $\beta$  – laktamowe [52]. Oporność ta ma charakter receptorowy i jest kodowana przez gen *mec A*, który jest zlokalizowany na chromosomie i stanowi część regionu noszącego nazwę SCC*mec* (gronkowcowa kasetta chromosomalna *mec*, ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*). Nabywanie metycylinooporności przez szczepy gronkowca złocistego ma związek z rozprzestrzenianiem się chromosomalnych kaset SCC*mec* zaliczanych do tzw. wysp genomowych [48, 56].

Gen *mec A* warunkuje syntezę nowego białka PBP (ang. Penicilin Binding Protein), tzw. PBP2' lub PBP2a. W odróżnieniu od pozostałych białek PBP, białko PBP2a nie ulega hamowaniu przez antybiotyki  $\beta$ -laktamowe z powodu obniżonego powinowactwa do tych antybiotyków. Białko PBP2a zachowuje swoją funkcję enzymatyczną i uczestniczy w syntezie ściany komórkowej, ale jego ekspresja zachodzi tylko w obecności  $\beta$ -laktamu. Oporność na metycylinę może mieć charakter homogeny, gdy wszystkie komórki danej populacji gronkowca oznaczane w badaniach *in vitro* wykazują fenotyp oporności lub heterogeny, gdy tylko część komórek danej populacji wykazuje fenotyp oporności [10, 12, 80]. Zarówno szczepy o homogennej jak i heterogennej oporności na metycylinę są klinicznie odporne na wszystkie antybiotyki  $\beta$  - laktamowe.

Aktualnie wyróżniamy pięć pandemicznych klonów szczepów MRSA [61]:

1. Klon iberyjski występujący głównie w Hiszpanii, Portugalii, we Włoszech i Francji.
2. Klon węgierski występujący na Węgrzech i Tajwanie.
3. Klon brazylijski występujący głównie w Ameryce Południowej.
4. Klon NY/Japoński.
5. Klon pediatryczny występujący w Portugalii, USA oraz w Polsce. Klon ten jest jednocześnie klonem CA – MRSA, opisanym ostatnio jako szczep pozaszpitalny MRSA.

Jak wspomniano, odporne na metycylinę gronkowce przez wiele lat występowały przede wszystkim w szpitalach. Niebezpiecznym zjawiskiem jest pojawienie się w ostatnich latach pozaszpitalnych toksynotwórczych szczepów MRSA tzw. CA-MRSA, których charakterystyczną cechą jest wytwarzanie tzw. leukocydyny Panton-Valentine, ważnego czynnika zjadliwości tych drobnoustrojów. Poza zakażeniami tkanek miękkich szczepy CA – MRSA powodują ciężkie zakażenia inwazyjne, dotykające, w przeciwieństwie do szpitalnych MRSA, młodych ludzi bez czynników ryzyka [20, 44, 93]. Niedawno zaobserwowano pojawienie się szczepów CA-MRSA również w środowisku szpitalnym [27, 87].



Ryc. 2. Klony MRSA [51, 61].

W 1996 roku w Japonii pojawiły się pierwsze szczepy MRSA o średniej oporności na wankomycynę VISA – vancomycin intermediate *S. aureus* [18, 45]. Mechanizm oporności wynika z pogrubienia ściany komórkowej (zwiększona synteza prekursorów peptydoglikanu) jednocześnie występuje niska aktywność enzymów autolitycznych (mutacje w genie regulatorowym *agr*) co skutkuje większą zjadliwością. Szczepy VISA zidentyfikowano również w Polsce [63].

Opisano również gronkowce odporne na wankomycynę (VRSA) [71], linezolid, chinuprystynę/ dalfoprystynę oraz daptomycynę [43, 92, 101, 109, 112].

### 1.1.3. Diagnostyka zakażeń *Staphylococcus aureus*

Hodowla pobranego materiału w temp. 37°C przez 18 – 24h na podłożu wybiórczo - różnicującym z mannitolem i dodatkiem 7.5% chlorku sodu, który hamuje wzrost większości drobnoustrojów z wyjątkiem gronkowców (agar Chapmana) oraz na agarze z 5% krwią baranią, umożliwiającym obserwację hemolizy typu  $\beta$  wokół kolonii.

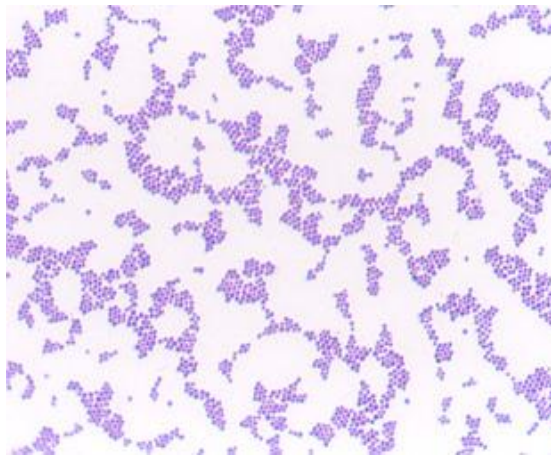


**Fot. 2.** Wzrost *S. aureus* na agarze z krwią.



**Fot. 3.** Wzrost *S. aureus* na podłożu Chapmana.

W preparatach wykonywanych z hodowli, barwionych metodą Grama można stwierdzić obecność barwiących się Gram - dodatnio ziarniaków układających się w grona (Fot. 4 ). Nie jest jednak możliwe odróżnienie gatunków saprofitycznych od chorobotwórczych (*Staphylococcus aureus*) [103].

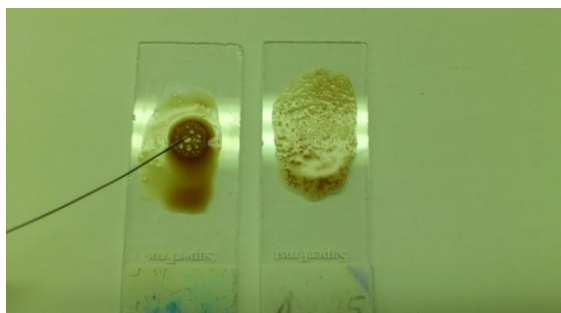


**Fot. 4.** *S. aureus* preparat barwiony metodą Grama.

Test na katalazę wykonuje się na szkiełku podstawowym nanosząc kroplę soli fizjologicznej, zawiesza się w niej szczep badany, następnie dodaje się wodę utlenioną. Pojawiające się pęcherzyki oznaczają, że szczep ten jest katalazo - dodatni.

Próba na obecność koagulazy związanej ze ścianą komórkową tzw. Clumping Factor (CF), który ścina fibrynogen bez udziału aktywatora, dlatego test na obecność CF daje natychmiastowe wyniki. Rutynowo wykonywany jest w wersji szkiełkowej, mieszając osocze królicze z wodną zawiesiną bakterii (Fot. 5). W przypadku *Staphylococcus aureus*

w ciągu 30s powstają charakterystyczne strąty [103, 104]. Zawiesina bakterii bez osocza powinna pozostawać homogenna, pojawienie się kłaczków w zawieszynie bez osocza świadczy o autoaglutynacji bakterii i nie może być podstawą do przyjęcia ujemnego lub dodatniego wyniku.



**Fot. 5.** Test szkiełkowy koagulaza związana CF (clumping factor).

Koagulaza wolna jest białkiem uwalnianym do otoczenia przez *S. aureus* oraz niektóre gatunki gronkowców występujące u zwierząt. Działa ona podobnie do protrombiny, przekształcając fibrynogen w fibrynę. W wyniku tego przekształcenia osocze ludzkie lub królicze ulega wykrzepianiu. W teście diagnostycznym jałowe osocze krwi króliczej w buforze cytrynianowym miesza się z jednorodną zawiesiną bakterii w wodzie. Pojawiający się w ciągu 1, 3, 6, 24 godzin skrzep (odczyn dodatni) (Fot. 6) świadczy o obecności *Staphylococcus aureus* [103].



**Fot. 6.** Test probówkowy koagulaza wolna.

Dla identyfikacji gatunku stosuje się biochemiczne test komercyjne np. Api ID 32 Staph (bioMerieux) (Fot. 7) lub automatyczne systemy identyfikacji typu Vitek System [104].



**Fot. 7.** Api ID 32 Staph (bioMerieux).

Molekularne metody identyfikacji przy użyciu gatunkowo specyficznego PCR służą również badaniom epidemiologicznym [104].

Szczepy MRSA identyfikuje się oznaczając wrażliwość na cefoksytynę metodą dyfuzyjno-krażkową lub oznacza się wrażliwość na oksacylinę na podłożu Muller – Hinton agar (MHA). Stosowana jest metoda mikrorozcieńczeń w bulionie [74] lub metoda dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku [31, 118].

Pomocny może być również test aglutynacji lateksu np. Slidex MRSA Detection (bioMerieux) (Fot. 8) wykrywający białko PBP2a, produkt genu *mecA* warunkującego oporność na metycylinę [85].



**Fot. 8.** Slidex MRSA Detection (bioMerieux), aglutynacja lateksu.

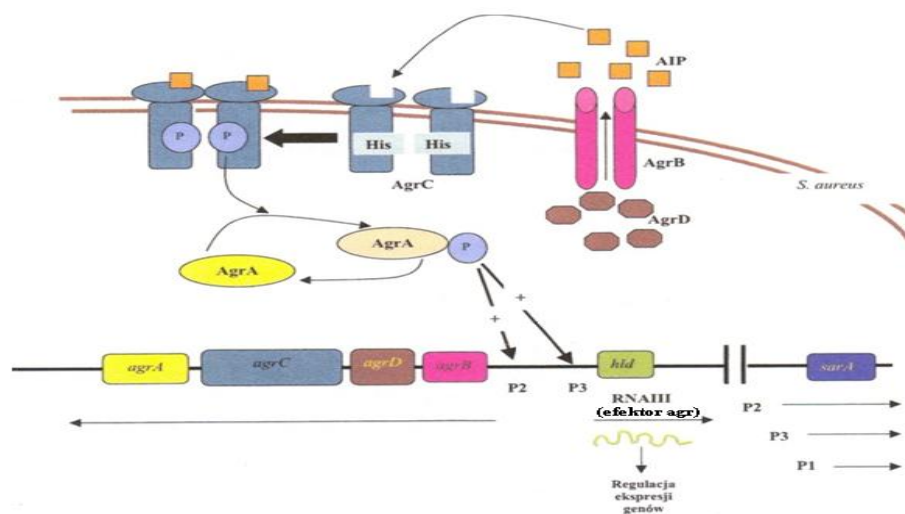
Jednak wykrywanie obecności genu *mecA* metoda PCR jest nadal uznawane za ”złoty standard” i powinno być wykonywane w przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników w metodach fenotypowych [118].



## 1.2. Charakterystyka systemu globalnej regulacji genów *agr* (accessory gene regulator)

Obecnie znany jest system globalnej regulacji genów *agr*, kontrolujący wytwarzanie czynników wirulencji u szczepów *S. aureus*. Zdolność bakterii do wywoływania różnorodnych stanów chorobowych przypisywana jest imponującej ilości zewnątrzkomórkowych oraz powierzchniowych czynników wirulencji produkowanych przez te mikroorganizmy. Ekspresja czynników wirulencji jest skoordynowana i kontrolowana przez system regulacji *agr* [21]. Locus *agr* kontroluje między innymi wytwarzanie enterotoksyn, toksyny TSST-1, eksfoliatyn A i B, leukocydyny Panton Valentin, hemolizyn:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , białek powierzchniowych: wiążących kolagen, fibrynogen, fibronektynę [13].

Locus *agr* jest związany z czterema genami *agr A*, *agr B*, *agr C*, *agr D*, genem *hld* oraz zawiera dwie jednostki transkrypcyjne RNA II i RNA III znajdujące się pod kontrolą promotorów P2 i P3 [13]. Aktywacja promotora P3 uruchamia transkrypcję RNA III, który jest cząsteczką efektorową systemu *agr* [40].



**Ryc. 3.** Zmodyfikowany schemat funkcjonowania systemu *agr* u *Staphylococcus aureus* [49, 52, 72].

Cząsteczką sygnałową jest białko Agr D, które przy udziale cząsteczki Agr B [52], będącej transbłonowym białkiem ulega modyfikacji i przekształceniu do cząsteczki autoinduktora AIP (autoinducing peptide). Następnie cząsteczka AIP aktywuje cząsteczkę sensorową Agr C, co prowadzi do fosforylacji i aktywacji białka Agr A, będącego cząsteczką efektorową. Białko Agr A poprzez oddziaływanie na transkrypt RNA III reguluje ekspresję genów wirulencji *S. aureus* [4].

Obecnie identyfikuje się i analizuje grupy specyficzności agr pod kątem ich związku z wywoływanymi chorobami przez szczepy *S. aureus*, co może być wykorzystywane w epidemiologii i klinice zakażeń *S. aureus* [23].

Polimorfizm locus *agr* (genów *agr C* i *agr D*) pozwolił na wyróżnienie w populacji gronkowców złocistych cztery grupy specyficzności *agr I*, *agr II*, *agr III*, *agr IV* [40]. Przynależność szczepu *S. aureus* do grupy *agr* jest skorelowana z jego przynależnością filogenetyczną, wytwarzaniem toksyn i wirulencją oraz z rodzajem wywoływanej infekcji [3, 21, 116, 117].

### 1.3. Charakterystyka badanych cytokin

Interferon gamma (INF- $\gamma$ ) jest wytwarzany przez aktywowane limfocyty T oraz komórki cytotoksyczne NK [84]. INF- $\gamma$  kodowany jest przez jeden gen zlokalizowany na chromosomie 12. Produkcja INF- $\gamma$  indukowana jest przez liczne cytokiny (m.in. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) [6, 108], a także przez sam INF- $\gamma$  [42]. Główną funkcją INF- $\gamma$  jest aktywacja makrofagów, działanie przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, antyproliferacyjne i immunomodulujące, a także aktywowanie limfocytów B do produkcji przeciwciał [24, 95]. INF- $\gamma$  hamuje limfocyty Th2, indukuje różnicowania limfocytów Th w kierunku limfocytów Th1 [102]. Indukuje syntezę IL-12 przez monocyty i makrofagi [7]. INF- $\gamma$  zwiększa wytwarzanie nadtlenków w granulocytach obojętnochłonnych i makrofagach, przez co nasila ich zdolność do zabijania bakterii i pierwotniaków [6].

Interleukina 4 (IL-4) jest produkowana przez aktywowane limfocyty T, komórki tuczne i bazofile. Pobudza limfocyty B, T, monocyty i makrofagi, indukuje wydzielanie cytokin prozapalnych, jest zaangażowana w tworzenie ogniska zapalnego. IL – 4 jest jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za syntezę Ig E i podtrzymywanie przewlekłego immunologicznego odczynu zapalnego warunkującego objawy chorób alergicznych [91]. Wzmaga także ekspresję cząsteczek MHC (główny układ zgodności tkankowej) klasy I i II na limfocytach B. Interleukina 4 przyczynia się do powstawania limfocytów T cytotoksycznych, wpływa również na monocyty i makrofagi poprzez wzmaganie ich cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych oraz fagocytozy i niszczenia pasożytów. Cytokina ta bierze również udział w procesie hematopoezy.

Interleukina 10 (IL-10) produkowana jest przede wszystkim przez limfocyty T i B, monocyty-makrofagi i keratynocyty [47]. Jednym z czynników pobudzających

wydzielanie IL-10 jest TNF- $\alpha$ . IL-10 wykazuje w szerokim zakresie zdolność osłabiania odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i hamowania odpowiedzi zapalnej. Działając na makrofagi i monocyty powoduje zmniejszenie syntezy TNF- $\alpha$ , IL-1, IL -6, IL -8, IL -12 i czynników wzrostowych [47]. Hamuje powstawanie limfocytów Th1 pobudzonych przez antygen i wytwarzanie przez nie IFN- $\gamma$  i IL-2. Obecność IL-10 w surowicy krwi obwodowej ma istotne znaczenie dla proliferacji i różnicowania aktywowanych limfocytów B, limfocytów Tc i dla aktywacji komórek NK [57]. IL-10 blokuje także wydzielanie prozapalnych mediatorów przez pobudzone lipopolisacharydem (LPS) eozynofile i komórki tuczne [76].

Interleukina 17A (IL-17A) jest prozapalną cytokiną wytwarzaną przez aktywowane limfocyty CD4+, której receptor jest obecny na różnych typach komórek. IL-17 oddziałuje plejotropowo na wiele komórek, m.in. na neutrofile, makrofagi, fibroblasty, komórki endo- i mezotelium. IL-17 wydaje się pełnić rolę mediatora odpowiedzi zapalnej w następstwie aktywacji limfocytów T i jest związana z niektórymi schorzeniami o podłożu zapalnym, autoimmunologicznym i nowotworowym [60]. Istnieje dodatnia korelacja między stężeniem IL-17 a zaawansowaniem procesu zapalnego.

IL - 17 wykazuje zdolności do indukcji ekspresji wielu mediatorów reakcji zapalnej, poprzez udział w proliferacji, dojrzewaniu i chemotaksji neutrofili [68, 115].

Czynnik martwicy nowotworów -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) jest wytwarzany głównie przez makrofagi. Może być też syntetyzowany przez komórki cytotoksyczne NK, komórki tuczne i komórki niektórych linii nowotworowych. Cytokina ta ma zdolność nekrotyzacji komórek nowotworowych, ma właściwości immunomodulujące oraz odgrywa istotną rolę w zapaleniu i wstrząsie septycznym [90]. TNF- $\alpha$  wykazuje wysoki stopień aktywności prozapalnej, często związany z IL-1 [94]. Zwiększa właściwości fagocytarne neutrofili oraz przyspiesza ich uwalnianie ze szpiku kostnego. TNF- $\alpha$  wraz z IFN- $\gamma$  indukuje ekspresję cząsteczek MHC (główny układ zgodności tkankowej). Ponieważ receptory dla TNF- $\alpha$  są obecne na wielu komórkach, posiada on wiele biologicznych właściwości. Między innymi może stymulować powstawanie fibroblastów i osteoklastów (komórek kościogubnych), angiogenezę (powstawanie nowych naczyń krwionośnych) oraz podnosić temperaturę ciała. Ze względu na swoje właściwości biologiczne TNF ma szerokie zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń i chorób.

Interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) jest cytokiną wytwarzaną głównie przez aktywowane monocyty i makrofagi. Najbardziej aktywną formą IL-1 $\beta$  jest jej rozszczepiona, dojrzała forma powstająca pod wpływem działania swoistej proteazy cysteinowej (enzym konwertujący IL-1) [19]. IL-1 jest określana jako czynnik aktywujący limfocyty. Receptory dla tej cytokiny stwierdzono na spoczynkowych limfocytach T i B, fibroblastach, keratynocytach, komórkach śródbłona i hepatocytach. IL-1 jest kostymulatorem limfocytów T nasilając wytwarzanie IL-2. IL-1 działa stymulująco na układ krwiotwórczy indukując wytwarzanie krwiotwórczych czynników wzrostowych oraz TNF, IL-2 i IL-6 [26]. IL-1 $\beta$  działa synergistycznie z czynnikami stymulującymi proliferację i różnicowanie limfocytów B oraz wytwarzanie przez nie przeciwciał.

Interleukina 12 (IL-12) jest produkowana głównie przez monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty B. IL-12 zbudowana jest z 4 helis alfa, jest ona heterodimerem złożonym z dwóch podjednostek: p40 i p35. IL-12 inicjuje różnicowanie limfocytów T w kierunku Th1 lub limfocytów Th2. IL-12 jest kluczowym induktorem Th1- zależnej odpowiedzi zapalnej, chroni przed zakażeniem i nowotworami, ale również bierze udział w autoimmunologicznej destrukcji tkanki [54]. Ponadto IL-12 wpływa na proliferację, cytotoksyczność limfocytów T i komórek NK, aktywuje limfocyty i komórki NK do produkcji INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  [25]. IL-12 pobudza wydzielanie IgG oraz hamuje wydzielanie IgE, a w warunkach *in vitro* jest odpowiedzialna za niektóre procesy krwiotworzenia.

Transformujący czynnik wzrostu- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) który wytwarzają komórki dendrytyczne, leukocyty i komórki NK, a ludzki gen odpowiedzialny za tworzenie tej cytokiny jest umiejscowiony na chromosomie 19 [46, 62, 66]. Działanie TGF- $\beta$ 1 polega na wspomaganiu procesów mających na celu regenerację uszkodzeń pourazowych bądź chorobowych. Druga podstawowa aktywność biologiczna TGF- $\beta$ 1 to działanie immunomodulacyjne [67]. Jest jednym z głównych czynników immunosupresyjnych blokujących oba typy odpowiedzi immunologicznej: komórkowej (Th1) i humoralnej (Th2), poprzez zahamowanie różnicowania limfocytów T oraz blokowania produkcji wielu cytokin [14]. Znosi działanie TNF- $\alpha$ . Stwierdzono, że TGF- $\beta$  1 wpływa immunosupresyjnie na limfocyty T i B, a brak tej cytokiny może predysponować do częstszego ujawniania się schorzeń z autoagresji, takich jak toczeń układowy czy sklerodermia układowa [16, 62, 79]. TGF- $\beta$ 1 odgrywa również rolę w patogenezie astmy oskrzelowej [66, 79, 98], stanów zapalnych naczyń, miażdżycy [32] oraz marskości

wątroby związanej z zakażeniem HCV. Wytwarzane są głównie w miejscu reakcji zapalnej, gdzie osiągają stosunkowo duże stężenia [2, 89], a także w stanach nasilonej regeneracji tkanek [111]. TGF –  $\beta$ 1 pełni wiele różnych funkcji, kontrolując wzrost komórek, ich proliferację, różnicowanie migrację komórek, formowanie i degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej, procesy chemotaksji i apoptozę [37, 58, 64, 82, 83, 88]. Wspomaga gojenie ran oraz produkcję Ig A.

## II. CELE PRACY

Celem pracy było zanalizowanie związanych z przewlekłymi zakażeniami szczepów *Staphylococcus aureus* i ich polimorfizmu systemu globalnej regulacji *agr* w kontekście oceny występującej odpowiedzi cytokinowej.

Dla realizacji powyższego celu przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Dokonanie oceny lekowrażliwości szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z przewlekłymi ropnymi chorobami skóry oraz od chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych.
2. Dokonanie oceny występowania grup specyficzności genów regulatorowych *agr* u szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z przewlekłymi ropnymi chorobami skóry oraz od chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych.
3. Ocena poziomów transformującego czynnika wzrostu- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) w surowicach badanych chorych.
4. Ocena poziomów cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 i IL-17A w surowicach badanych chorych.
5. Ocena poziomów cytokin prozapalnych wytwarzanych przez monocyty/makrofagi: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 w surowicach badanych chorych.

### **III. MATERIAŁY I METODY BADAŃ**

#### **3.1. Badania kliniczne**

Badaniami objęto pacjentów dorosłych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry związanymi z zakażeniem *S. aureus* oraz pacjentów z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych związanymi z zakażeniem *S. aureus*. Badane grupy zostały wyłonione w latach 2009 – 2011 spośród pacjentów zgłaszających się na podstawie skierowań lekarzy dermatologów i laryngologów do Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej U.M. im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupę kontrolną wyłoniono spośród pacjentów nie będących nosicielami *S. aureus* zgłaszających się na badania kontrolne.

Kryterium włączającym do badania był obraz kliniczny choroby, dokumentowany przewlekłym zakażeniem bakteryjnym o etiologii *S. aureus*, trwającym średnio przez 6-12 miesięcy. Kryteriami włączającymi do badania, dla pacjentów grupy kontrolnej, był dobry stan ogólny, brak jakichkolwiek zmian skórnych, brak infekcji o etiologii gronkowcowej oraz brak nosicielstwa *S. aureus*.

Badana populacja obejmowała 3 grupy pacjentów:

Grupa I obejmowała 50 pacjentów (28 mężczyzn i 22 kobiety w wieku 18-52 lat; średnia wieku:  $35,3 \pm 9,2$ ) z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry związanymi z zakażeniem *S. aureus*.

Grupa II zawierała 40 pacjentów (18 mężczyzn i 22 kobiety w wieku 18-52 lat; średnia wieku :  $36,4 \pm 9,4$ ) z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (rhinopharyngitis) związanymi z zakażeniem *S. aureus*.

Grupę III (kontrolną) stanowiło 25 zdrowych osób (11 mężczyzn i 14 kobiet w wieku 18-50 lat; średnia wieku:  $33,6 \pm 9,4$ ).

#### **3.2. Przygotowanie materiału do badań mikrobiologicznych**

Do badań pobierano wymazy odpowiednio z ropnych zmian skórnych oraz z tylnej ściany gardła od pacjentów nie będących pod wpływem antybiotyku w ostatnich trzech tygodniach. Natychmiast po pobraniu materiał posiewano na podłoża mikrobiologiczne.

### 3.3. Badania mikrobiologiczne i immunologiczne

#### 3.3.1. Hodowla bakterii *Staphylococcus aureus*

Do diagnostyki mikrobiologicznej w warunkach tlenowych wykorzystano podłoża stałe: agar wzbogacony z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz podłoże Chapmana, zawierające w swoim składzie:

1) Agar wzbogacony z 5% krwią baranią:

- agar wzbogacony o pH 7.4 -7.6
- 5% krew barania (30ml krwi na 500ml podłoża agarowego)

Do rozpuszczonego, oziębionego do temperatury 40-50°C agaru, dodawano jałowej odwłóknionej krwi baraniej. Dokładnie mieszano i rozlewano na płytki Petriego.

2) Podłoże Chapmana:

- wyciąg wołowy 1g
  - trzustkowy hydrolizat kazeiny 5g
  - hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej 5g
  - NaCl (75 g)
  - agar (15 g)
  - mannitol (10 g)
  - czerwień fenolowa roztwór 0.2% w 50% alkoholu etylowym (12.5 ml)
  - 1000ml wody destylowanej
- pH 7,4 ± 0,2

Sterylizowano w temp. 121° C, 15min.

Podłoże wybiórczo-różnicujące, przeznaczone do izolacji gronkowców. Duże stężenia NaCl (7,5%) hamuje wzrost flory towarzyszącej, zwłaszcza pałeczek Gram-ujemnych. Rozkład zawartego w podłożu mannitolu pozwala na wstępne różnicowanie gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus*. Dodatek wskaźnika – czerwieni fenolowej sprawia, że kolonie bakterii rozkładające mannitol są żółte.

Hodowlę przeprowadzano na podłożu agar wzbogacony z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz na podłożu Chapmana w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 24h. Dla uzyskania czystej hodowli oraz pojedynczych kolonii stosowano technikę posiewu redukcyjnego. Właściwości morfologiczne i biochemiczne wyhodowanych szczepów *S. aureus*, potwierdzano barwieniem metodą Grama oraz testem na obecność



koagulazy związanej (clumping factor) i wolnej. Ostateczną identyfikację gatunkową dokonywano testem API ID 32 Staph (bioMerieux).

Szczepy MRSA identyfikowano oznaczając wrażliwość na cefoksytynę (FOX) 30 µg, (interpretacja wg EUCAST: cefoksytyna R ≤ 21mm dla *S. aureus*), następnie oznaczano MIC (minimalnego stężenia hamującego) dla oksacyliny (OX) metodą E –test; (interpretacja wg EUCAST: oksacylina R ≥ 2 dla *S. aureus*).

Wykonano test aglutynacji lateksu Slidex MRSA Detection (bioMerieux) wykrywający białko PBP2a, produkt genu *mecA* warunkującego oporność na metycylinę. Cząsteczki lateksu opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko białku PBP2a reagują specyficznie ze szczepami MRSA, dając widoczną gołym okiem aglutynację. Test wykonywano używając kilku badanych kolonii pochodzących z agaru z 5% krwią, które zawieszano w odczynniku ekstrakcyjnym (0.1M NaOH) i gotowano przez 3 minuty. Następnie dodawano kroplę 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, intensywnie wortexowano oraz wirowano około 4,5 RPM, 5 minut. Do reakcji używano 50 µl supernatantu, który nakrapiano na pole testowe i mieszano z 50 µl odczynnika lateksowego. Dodatnia reakcja aglutynacji uwidacznia się w ciągu 3 minut. Jednocześnie wykonywano kontrolę ujemną.

### 3.3.2. Oznaczanie lekowrażliwości badanych szczepów *Staphylococcus aureus*

Oznaczenie lekowrażliwości gronkowców metodą dyfuzyjno – krążkową (metoda Kirby-Bauera) przeprowadzono na podłożu Mueller – Hinton agar (MHA), zawierającego w swoim składzie:

- wyciąg wołowy 2g
- kwaśny hydrolyzate kazeiny 17,5g
- skrobia 1,5g
- agar 17g
- 1000ml wody destylowanej

pH 7,3 ± 0,2

Sterylizowano w temp. 121° C, 15min.

Stosowano zawiesinę badanych szczepów o gęstości 0,5 McFarlanda. Używano krążki z następującymi antybiotykami:

cefoksytyna (FOX) 30 µg

erytromycyna (E) 15 µg

kindamycyna (Da) 2 µg

trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) 1,25/23,75 µg

Antybiogramy inkubowano przez 24h w temp. 35°C, w atmosferze tlenowej. Następnie wykonano pomiar stref zahamowania wzrostu (zwracając szczególną uwagę na pojedyncze kolonie w strefie). Odczyt przeprowadzano w świetle odbitym. Uzyskane wartości interpretowano zgodnie z zaleceniami EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2010).

Szczepy wzorcowe:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - wrażliwy na metycylinę

*Staphylococcus aureus* ATCC 43300 - oporny na metycylinę

Oznaczanie MIC (minimalnego stężenia hamującego) oksacyliny (OX) dla szczepów MRSA wykonano metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku (E – test) zgodnie z zaleceniami producenta [31].

Do oznaczenia stosowano podłoże Mueller Hinton agar (MHA) z dodatkiem 2% NaCl oraz zawiesinę badanych szczepów o gęstości 0,5 McFarlanda, którą nanoszono wymazówką na płytki z podłożem rozprowadzając w trzech kierunkach. Na wysiane podłoża nanoszono pasek z oksacyliną. Prowadzono inkubację przez 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej. Następnie odczytywano wyniki w świetle przechodzącym z użyciem lupy. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktowano jako oporność na dane stężenie antybiotyku. Uzyskane wartości interpretowano zgodnie z zaleceniami EUCAST.

### **3.3.3. Ekstrakcja DNA**

Do izolacji DNA używano zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology). Zestaw opiera się na zdolności wiązania się DNA genomowego do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Do próbki 1.5 ml pobierano 100 µl hodowli bakteryjnej (*S. aureus*) uprzednio wstępnie traktowanej lysostafiną (zawieszano bakterie w buforze TE – stężony Tris + EDTA; dodawano 10 µl roztworu lysostafiny o stężeniu 1 mg/ml i inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C). Następnie dodawano 200 µl uniwersalnego buforu lizującego LT i 20 µl roztworu Proteinyazy K. Całość wymieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut, po czym przeniesiono do 75° C i inkubowano 5 min. Próbkę intensywnie wortexowano przez 20 sekund, wirowano 3 min. przy 10-15 tys. RPM. Pobrano supernatant i nanoszono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA. Wirowano 1 min. przy 10-15 tys. RPM, następnie

dodawano do kolumny 500 µl roztworu płuczącego i ponownie wirowano 1 min. przy 10-15 tys. RPM. Minikolumnę przenoszono do nowej probówki 2 ml i dodawano 400 µl roztworu płuczącego. Wirowano 2 min. przy 10-15 tys. RPM. Osuszoną minikolumnę umieszczano w nowej probówce 1.5 ml i dodawano 200 µl buforu Tris (10mM TRIS.HCl pH 8.5) uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C. Inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 min. przy 10-15 tys. RPM. Minikolumnę usuwano, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przechowywano w temp. - 20°C do czasu dalszych analiz.

### 3.3.3.1. Wykrywanie genu *mecA*

Do wykrywania genu *mecA* stosowano zestaw diagnostyczny duplex PCR. Reakcja PCR została przeprowadzona w 25 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1 x bufor PCR zawierający 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM każdego trójfosforanu deoksynukleotydu, 2,5 µM polimerazy *Taq*, 0.2 µM każdego startera oraz 1 µl matrycy DNA.

Zastosowano następujące startery reakcji PCR:

*mecA*: MecA1 (5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA)

i MecA2 (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA)

*femB*: FemB1 (5'-TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC)

i FemB2 (5'-ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT)

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf), w następujących warunkach amplifikacji:

- denaturacja wstępna w temperaturze 94°C przez 4 min
- denaturacja 94°C przez 45s
- dołączanie starterów 50°C przez 45 s
- elongacja 72°C przez 60 s
- wydłużanie końcowe 72°C przez 2 min

Liczba cykli w reakcji PCR wynosiła 30. Produkt PCR poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym i po barwieniu bromkiem etydydy odczytywano wynik. Za wynik pozytywny przyjmowano obecność produktów reakcji PCR o wielkości 310 par zasad dla genu *mecA* i 651 par zasad dla *femB*.

### 3.3.3.2. Wykrywanie grup specyficzności *agr*

Do wykrywania genów grup specyficzności *agr* użyto dwóch reakcji duplex PCR wg metody Shopsisin i wsp. [97]. Wczesny primer (5'-ATGCACATGGTGCACATGC-3') należący do konserwatywnej sekwencji genu *agr B* używano we wszystkich reakcjach. Sekwencje specyficzne dla każdego genu *agr* były amplifikowane przez 4 primery oparte o polimorfizm nukleotydów genów *agr D* lub *agr C*.

Zastosowano następujące startery reakcji PCR:

-*agr I*, 5'-GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3' (dla genu *agrD*, wielkość produktu: 440 bp);

-*agr II*, 5'-GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC-3' (dla genu *agrC*, wielkość produktu: 572 bp);

-*agr III*, 5'-CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC-3' (dla genu *agrD*, wielkość produktu: 406 bp);

-*agr IV*, 5'-CGATAATGCCGTAATACCCG-3' (dla genu *agrC*, wielkość produktu: 588 bp).

Ponieważ rozmiary produktów reakcji PCR dla grup *agr I* i *III* oraz *II* i *IV* były podobne, wykonano 2 reakcje duplex PCR.

Reakcja PCR została przeprowadzona w 25  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 10  $\mu$ l 10  $\times$  stężonego buforu PCR, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 2.5 jednostek polimerazy Taq, 20 pmol każdego primera oraz 1  $\mu$ l matrycy DNA. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf), w następujących warunkach amplifikacji:

- denaturacja wstępna 94°C 5 min,

- denaturacja 94°C, 1 min,

- dołączanie starterów 55°C, 1 min,

- elongacja 72°C, 1 min,

- wydłużanie końcowe 72°C, 2 min.

Liczba cykli w reakcji PCR wynosiła 30. Produkty PCR poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym i po barwieniu bromkiem etydydny odczytywano wynik.

### **3.3.4. Oznaczanie cytokin**

#### **3.3.4.1 . Oznaczanie surowiczego INF- $\gamma$**

Oznaczanie INF- $\gamma$  wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości - Human INF- $\gamma$  HS Immunoassay (eBioscience), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,06 pg/ml.

#### **3.3.4.2. Oznaczanie surowiczej IL-4**

Oznaczanie IL-4 wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości - Quantikine HS Human IL-4 Immunoassay (R&D System), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,11 pg/ml.

#### **3.3.4.3. Oznaczanie surowiczej IL-10**

Oznaczanie IL-10 wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości - Quantikine HS Human IL-10 Immunoassay (R&D System), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą poniżej 0,5 pg/ml.

#### **3.3.4.4. Oznaczanie surowiczej IL-17A**

Oznaczanie IL – 17 wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu - Human IL-17 Platinum Immunoassay (eBioscience), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,5 pg/ml.

#### **3.3.4.5. Oznaczanie surowiczego TNF- $\alpha$**

Oznaczanie TNF- $\alpha$  wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości - Quantikine HS Human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A Immunoassay (R&D Systems), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,106 pg/ml.

#### **3.3.4.6. Oznaczanie surowiczej IL-1 $\beta$**

Oznaczanie IL-1 $\beta$  wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości - Quantikine HS Human IL-1 $\beta$ /IL-1F2

Immunoassay (R&D System), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,057 pg/ml.

#### 3.3.4.7. Oznaczanie surowiczej IL-12

Oznaczanie IL-12 wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości - Human IL-12p70 HS Immunoassay (eBioscience), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,1 pg/ml.

#### 3.3.4.8. Oznaczanie surowiczego TGF- $\beta$ 1

Oznaczanie TGF-  $\beta$ 1 wykonano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu - Quantikine Human TGF-  $\beta$ 1 Immunoassay (R&D System), charakteryzujący się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 4,61 pg/ml.

Badania wszystkich cytokin wykonywano zgodnie z protokołami producentów. Wartość absorbancji, w zależności od badanej cytokiny, odczytywano przy długości fali  $\lambda = 450\text{nm}$  lub  $490\text{nm}$  za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux). Wyniki obliczano z wyznaczeniem krzywej standardowej.

### 3.4. Analiza statystyczna wyników

Uzyskane w badaniach wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 8 dla systemu operacyjnego Windows. W analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne, które pozwalają na wyliczenie szerokiego zakresu różnych miar położenia (średnia) i dyspersji (odchylenie standardowe) dając w ten sposób pełny obraz danych. Są to metody niezależne od parametrów lub niezależne od rozkładu.

W analizie porównawczej poziomów cytokin w badanych grupach zastosowano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa z testem Dunn'a. Test rangowy Kruskala-Wallisa sprawdza czy w układzie 3 grup znajdują się 2 grupy, które różnią się między sobą istotnie ( $p < 0,05$ ). W przypadku wystąpienia takich dwóch grup stosowano test Dunn' a, który wykrywa różniące się między sobą grupy.

W analizie porównawczej występowania grup specyficzności agr zastosowano test Gaussa wskazujący na różnicę pomiędzy dwoma wskaźnikami struktury.

Różnicę uznawano za istotną statystycznie jeśli  $p < 0,05$ , natomiast wysoce istotne różnice weryfikowano przy poziomie istotności  $p < 0,001$ .

## IV. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

### 4.1 Analiza kliniczna badanych grup pacjentów

#### 4.1.1. Ocena struktury badanej populacji

Badaniami objęto 90 dorosłych chorych obojga płci z potwierdzonym zakażeniem *Staphylococcus aureus*. W obrębie badanej populacji, wyróżniono dwie grupy chorych. Pierwszą stanowili chorzy z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry związanymi z zakażeniem *S. aureus* (grupa I), natomiast drugą pacjenci z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (rhinopharyngitis) związanymi z zakażeniem *S. aureus* (II grupa). Trzecią grupę – kontrolną stanowiło 25 zdrowych osób.

**Grupa I** obejmowała 50 pacjentów (28 mężczyzn i 22 kobiety w wieku 18-52 lat; średnia wieku:  $35,3 \pm 9,2$ ).

**Grupę II** stanowiło 40 pacjentów (18 mężczyzn i 22 kobiety w wieku 18-52 lat; średnia wieku:  $36,4 \pm 9,4$ ).

**Grupa III** obejmowała 25 zdrowych osób (11 mężczyzn i 14 kobiet w wieku 18-50 lat; średnia wieku:  $33,6 \pm 9,4$ ).

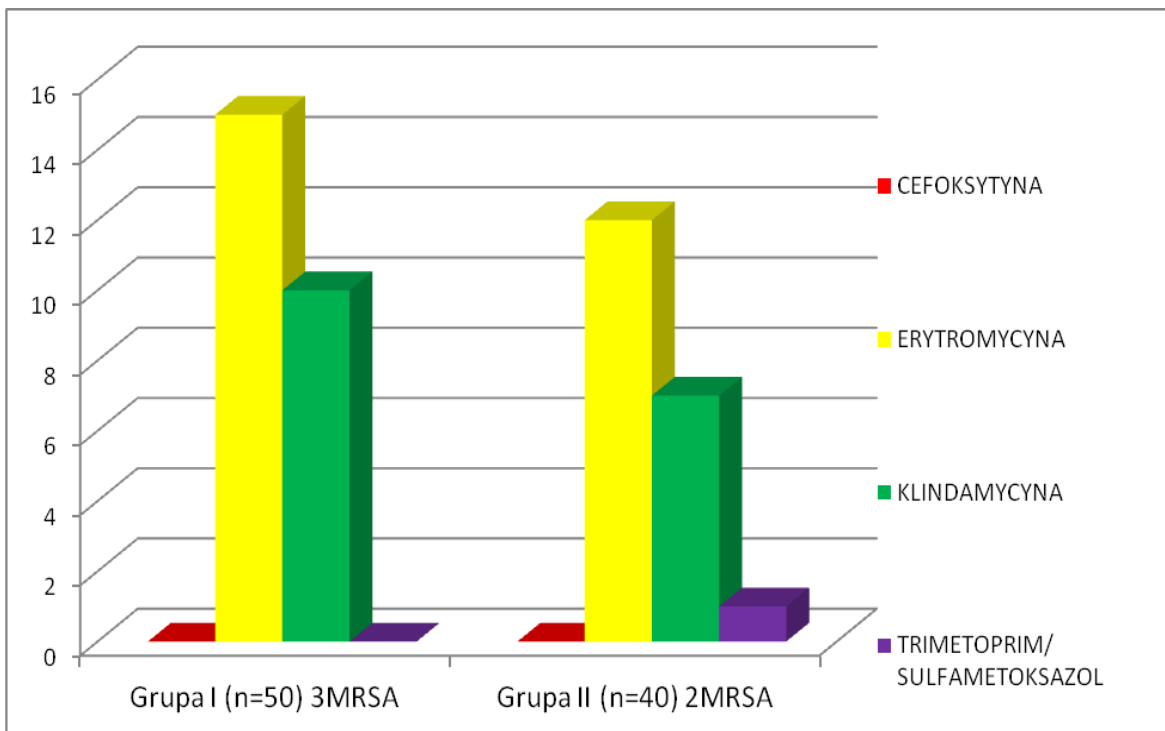


#### 4.2. Ocena lekowrażliwości *Staphylococcus aureus*

Występowanie szczepów MRSA stwierdzono u 5 chorych (5,6 %); 3 przypadki u pacjentów z zakażeniami skóry (grupa I) oraz 2 przypadki u chorych z zakażeniem górnych dróg oddechowych (grupa II). Oporność na erytromycynę wystąpiła u 27 chorych; odpowiednio u 15 osób z zakażeniami skóry (grupa I) i u 12 pacjentów z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II). Brak wrażliwości na klindamycynę wystąpił u 17 chorych; 10 chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u 7 chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II). Oporność na trimetoprim/ sulfametoksazol stwierdzono u 1 chorego z zakażeniem górnych dróg oddechowych (grupa II). Uzyskane wyniki oznaczeń lekooporności przedstawiono w tabeli 1 oraz na rycinie 3.

*Tab. 1. Zestawienie liczbowe analizy lekooporności u izolowanych szczepów S. aureus.*

Antybiotyki	Grupa I		Grupa II	
	S	R	S	R
	liczba	liczba	liczba	liczba
	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Cefoksytyna (FOX)</b>	<b>47 (94)</b>	<b>3 (MRSA) (6)</b>	<b>38 (95)</b>	<b>2 (MRSA) (5)</b>
<b>Erytromycyna (E)</b>	<b>35 (70)</b>	<b>15 (30)</b>	<b>28 (70)</b>	<b>12 (30)</b>
<b>Klindamycyna (Da)</b>	<b>40 (80)</b>	<b>10 (20)</b>	<b>33 (82,5)</b>	<b>7 (17,5)</b>
<b>Trimetoprim/ sulfametoksazol (SXT)</b>	<b>50 (100)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>39 (97,5)</b>	<b>1 (2,5)</b>



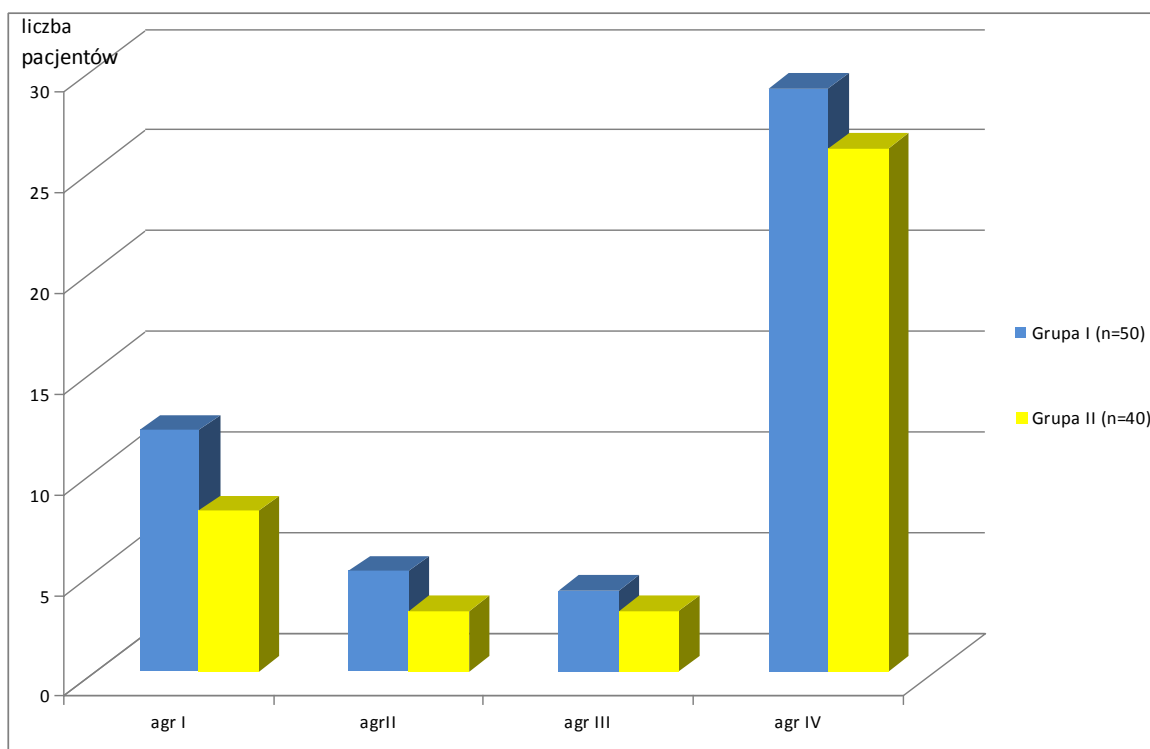
**Ryc. 4.** Graficzne przedstawienie lekooporności badanych szczepów *S. aureus* w grupie chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).

#### 4.3. Ocena występowania grup specyficzności agr u *Staphylococcus aureus*

Występowanie grup specyficzności *agr* kształtowało się następująco: u 20 osób stwierdzono szczepy należące do *agr* I w tym 12 w grupie z zakażeniami skóry (grupa I) i 8 wśród pacjentów z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II). Przynależność do *agr* II stwierdzono u 8 chorych w tym u 5 z zakażeniami skóry oraz u 3 z zakażeniami górnych dróg oddechowych. Występowanie *agr* III oznaczono u 7 chorych: u 4 z zakażeniami skóry oraz u 3 zakażeniami górnych dróg oddechowych. Przynależność do *agr* IV wystąpiła u szczepów od 55 chorych, w tym u 29 z zakażeniami skóry (grupa I) i u 26 z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).

**Tab. 2.** Zestawienie występowania grup specyficzności agr wśród badanych szczepów *S. aureus* u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).

agr	grupa I (n=50)	grupa II (n=40)	p pomiędzy grupami I vs II
I	12 (24%)	8 (20%)	p=0,6513
II	5 (10%)	3 (7,5%)	p=0,6798
III	4 (8%)	3 (7,5%)	p=0,8588
IV	29 (58%)	26 (65%)	p=0,5003



**Ryc. 5.** Graficzne przedstawienie występowania grup specyficzności agr wśród badanych szczepów *S. aureus* u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że wartości w obrębie poszczególnych grup specyficzności agr I, II, III, IV nie różniły się istotnie statystycznie (p=0,6725)

pomiędzy grupą chorych z zakażeniem skóry (grupa I), a grupą chorych z zakażeniami gardła (grupa II).

Wyniki oznaczeń statystycznych grup specyficzności agr u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) kształtowały się następująco: agr I vs agr II nie różniły się istotnie statystycznie ( $p=0,0654$ ), agr I vs agr III były istotnie zwiększone ( $p=0,0315$ ), agr I vs agr IV były istotnie zwiększone ( $p=0,0008$ ), agr II vs agr III nie różniły się istotnie statystycznie ( $p=0,7275$ ), agr II vs agr IV wartości były istotnie zwiększone ( $p<0,0001$ ), agr III vs agr IV wartości były istotnie zwiększone ( $p<0,0001$ ).

Wyniki oznaczeń statystycznych grup specyficzności agr u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) kształtowały się następująco: agr I vs agr II nie różniły się istotnie statystycznie ( $p=0,1086$ ), agr I vs agr III nie różniły się istotnie statystycznie ( $p=0,1086$ ), agr I vs agr IV były istotnie zwiększone ( $p=0,0001$ ), agr II vs agr III nie różniły się istotnie statystycznie ( $p=1,0000$ ), agr II vs agr IV wartości były istotnie zwiększone ( $p<0,0001$ ), agr III vs agr IV wartości były istotnie zwiększone ( $p<0,0001$ ). Uzyskane wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 2-3 oraz na rycinie 4.

**Tab. 3.** Analiza statystyczna poziomu istotności pomiędzy grupami agr u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).

agr	grupa I			grupa II		
	II	III	IV	II	III	IV
I	I vs II $p=0,0654$	I vs III $p=0,0315^*$	I vs IV $p=0,0008^*$	I vs II $p=0,1086$	I vs III $p=0,1086$	I vs IV $p=0,0001^*$
II	-	II vs III $p=0,7275$	II vs IV $p<0,0001^*$	-	II vs III $p=1,0000$	II vs IV $p<0,0001^*$
III	-	-	III vs IV $p<0,0001^*$	-	-	III vs IV $p<0,0001^*$
IV	-	-	-	-	-	-

\* oznaczono różnicę statystycznie istotną ( $p<0,05$ )

#### 4.4. Ocena surowiczych poziomów TGF-β1

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń TGF-β1 przedstawiono w tabeli 4 oraz na rycinie 6. W surowicy krwi osób zdrowych - grupa kontrolna (grupa III) - uzyskane wartości badanej TGF-β1 średnio wynosiły 19,33±8,46 ng/ml. W surowicach chorych z zakażeniami skóry (grupa I) wartości wynosiły 16,21 ± 8,61 ng/ml. W surowicy chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) wartości wynosiły 15,84 ± 8,94 ng/ml.

**Tab. 4.** Zestawienie wyników surowiczego TGF – β1 wraz z analizą statystyczną u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) i w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).

Badana cytokina [ng/ml]	Grupy chorych			Poziom istotności (p)
	Grupa I (n = 50)	Grupa II (n = 40)	Grupa III (n = 25)	
TGF-β1	16,21 ± 8,61	15,84 ± 8,94	19,33 ± 8,46	p=0.1516

#### 4.5. Ocena surowiczych poziomów cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th (IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17A)

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń cytokin: IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17A, przedstawiono w tabeli 8 oraz na rycinach 9-12. W surowicy krwi osób zdrowych - grupa kontrolna (grupa III) - uzyskane wartości badanych cytokin średnio wynosiły 0,44 ± 0,33 pg/ml dla IFN-γ, 0,24 ± 0,12 pg/ml dla IL-4, 1,58 ± 0,97 pg/ml dla IL-10, 1,93 ± 0,83 pg/ml dla IL-17A. W surowicach chorych z zakażeniami skóry (grupa I) wartości oznaczanych cytokin średnio wynosiły: 0,98 ± 0,55 pg/ml dla IFN-γ, 0,29 ± 0,14 pg/ml dla IL-4, 1,82 ± 1,28 pg/ml dla IL-10, 4,93 ± 1,54 pg/ml dla IL-17A. W surowicach pacjentów z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) wartości wynosiły: 0,87 ± 0,51 pg/ml dla IFN-γ, 0,28 ± 0,14 pg/ml dla IL-4, 1,72 ± 1,28 pg/ml dla IL-10, 4,87 ± 1,57 pg/ml dla IL-17A.

**Tab. 5.** Zestawienie wyników badanych cytokin wraz z analizą statystyczną (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17A) u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) i u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).

Badana cytokina [pg/ml]	Grupy chorych			Poziom istotności (p)
	Grupa I (n = 50)	Grupa II (n = 40)	Grupa III (n = 25)	
IFN- $\gamma$	0,98 $\pm$ 0,55	0,87 $\pm$ 0,51	0,44 $\pm$ 0,33	III vs II p<0.0001* III vs I p<0.0001* II vs I p>0.05
IL-4	0,29 $\pm$ 0,14	0,28 $\pm$ 0,14	0,24 $\pm$ 0,12	p=0.2297
IL-10	1,82 $\pm$ 1,28	1,72 $\pm$ 1,28	1,58 $\pm$ 0,97	p=0.8799
IL-17A	4,93 $\pm$ 1,54	4,87 $\pm$ 1,57	1,93 $\pm$ 0,83	III vs II p<0.0001* III vs I p<0.0001* II vs I p>0.05

\* oznaczono różnicę statystycznie istotną względem grupy kontrolnej (p<0,05)

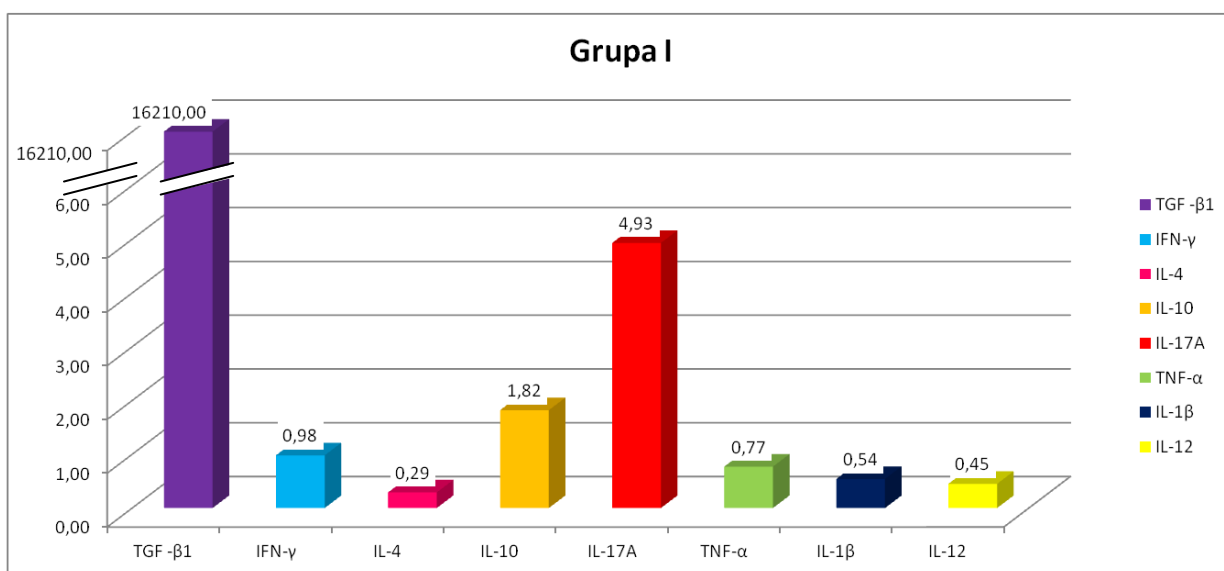
#### 4.6. Ocena surowiczych poziomów cytokin prozapalnych (monokin) wytwarzanych przez monocyty/makrofagi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12)

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, przedstawiono w tabeli 6 oraz na rycinach 13-15. W surowicy krwi osób zdrowych - grupa kontrolna (grupa III) - uzyskane wartości badanych cytokin średnio wynosiły: 0,61  $\pm$  0,36 pg/ml dla TNF- $\alpha$ , 0,26  $\pm$  0,14 pg/ml dla IL-1 $\beta$ , 0,38  $\pm$  0,31 pg/ml dla IL-12. W surowicach chorych z zakażeniami skóry (grupa I) wartości oznaczanych cytokin wynosiły średnio: 0,77  $\pm$  0,39 pg/ml dla TNF- $\alpha$ , 0,54  $\pm$  0,25 pg/ml dla IL-1 $\beta$ , 0,45  $\pm$  0,35 pg/ml dla IL-12. W surowicach pacjentów z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) wartości wynosiły: 0,74  $\pm$  0,3 pg/ml dla TNF- $\alpha$ , 0,50  $\pm$  0,25 pg/ml dla IL-1 $\beta$ , 0,42  $\pm$  0,33 pg/ml dla IL-12.

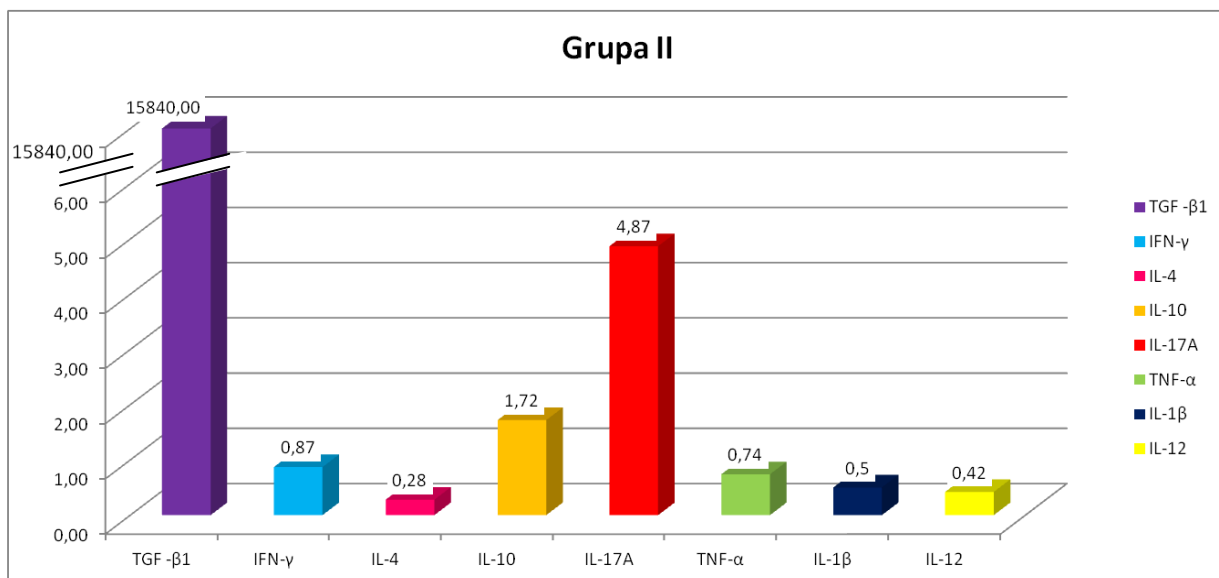
**Tab. 6.** Zestawienie wyników badanych cytokin oraz analiza statystyczna (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12) u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) i u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).

Badana cytokina [pg/ml]	Grupy chorych			Poziom istotności (p)
	Grupa I (n = 50)	Grupa II (n = 40)	Grupa III (n = 25)	
TNF- $\alpha$	0,77 $\pm$ 0,39	0,74 $\pm$ 0,3	0,61 $\pm$ 0,36	p=0.1853
IL-1 $\beta$	0,54 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,25	0,26 $\pm$ 0,14	II vs I p>0.05 III vs I p<0.0001 * III vs II p<0.0001 *
IL-12	0,45 $\pm$ 0,35	0,42 $\pm$ 0,33	0,38 $\pm$ 0,31	p=0.7512

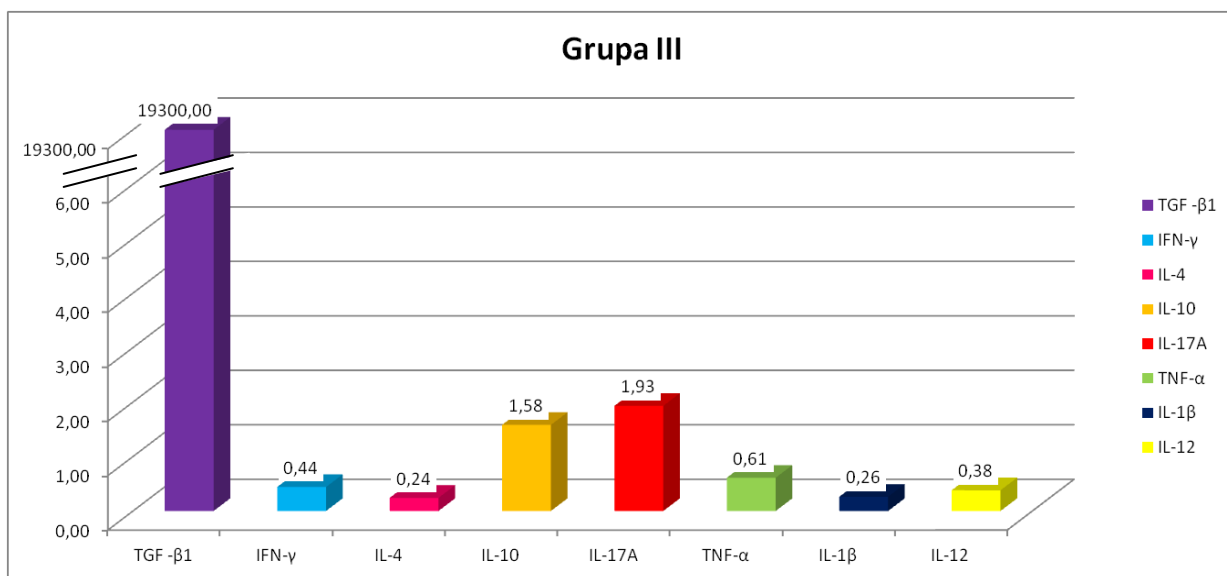
\* oznaczono różnicę statystycznie istotną względem grupy kontrolnej (p<0,05)



**Ryc. 6.** Graficzne przedstawienie średnich wartości poziomów badanych cytokin (pg/ml) w grupie chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I).



**Ryc. 7.** Graficzne przedstawienie średnich wartości poziomów badanych cytokin (pg/ml) w grupie chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych związanymi z zakażeniem *S. aureus* (grupa II).



**Ryc. 8.** Graficzne przedstawienie średnich wartości poziomów badanych cytokin (pg/ml) w grupie kontrolnej (grupa III).



Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że stężenia TGF- $\beta$ 1 nie różniły się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami ( $p=0.1516$ ).

Wyniki oznaczeń IFN- $\gamma$  były istotnie zwiększone ( $p<0.0001$ ) w grupach chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) w porównaniu z grupą kontrolną (grupa III). Jednocześnie wartości stężeń IFN- $\gamma$  nie różniły się statystycznie pomiędzy grupą I i II ( $p>0.05$ ).

Wyniki oznaczeń IL-4 i IL-10 nie różniły się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami ( $p>0,05$ ).

Wyniki oznaczeń IL-17A były istotnie zwiększone ( $p<0.0001$ ) w grupach chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) w porównaniu z grupą kontrolną (grupa III). Jednocześnie wartości stężeń IL-17A nie różniły się statystycznie pomiędzy grupą I i II ( $p>0.05$ ).

Wyniki oznaczeń TNF- $\alpha$  nie różniły się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami ( $p=0.1853$ ).

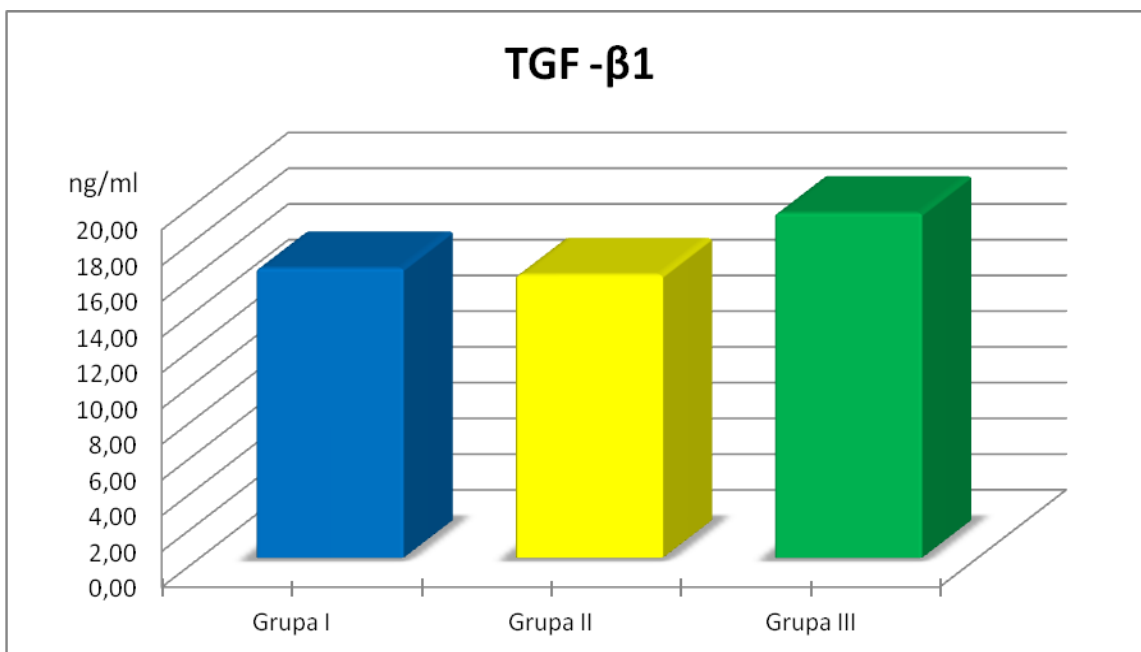
Wyniki oznaczeń IL-1 $\beta$  były istotnie zwiększone ( $p<0.0001$ ) w grupach chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) w porównaniu z grupą kontrolną (grupa III). Jednocześnie wartości stężeń IL-1 $\beta$  nie różniły się statystycznie pomiędzy grupą I i II ( $p>0.05$ ).

Wartości oznaczeń IL-12 nie różniły się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami ( $p=0.7512$ ).

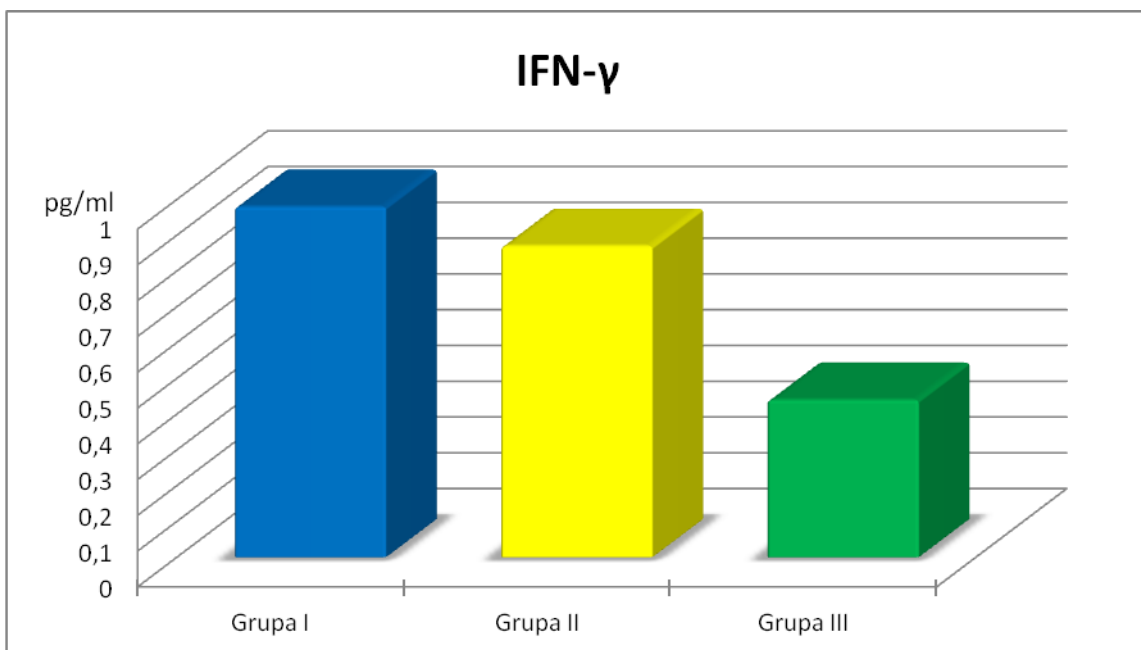
**Tab. 7.** Analiza statystyczna poziomu cytokin (TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12) w surowicach chorych w z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz w surowicach chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).

		<b>Badane cytokiny</b>							
		<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-17A</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-12</b>
<b>Badani</b>									
<b>chorzy</b>		<b>poziom istotności różnic między grupami chorych</b>							
<b>grupa I / grupa II</b>		<b>p=0,1516</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p=0.2297</b>	<b>p=0.8799</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p=0.1853</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p=0.7512</b>
<b>grupa I / grupa III</b>		<b>p=0,1516</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p=0.2297</b>	<b>p=0.8799</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p=0.1853</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p=0.7512</b>
<b>grupa II / grupa III</b>		<b>p=0,1516</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p=0.2297</b>	<b>p=0.8799</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p=0.1853</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p=0.7512</b>

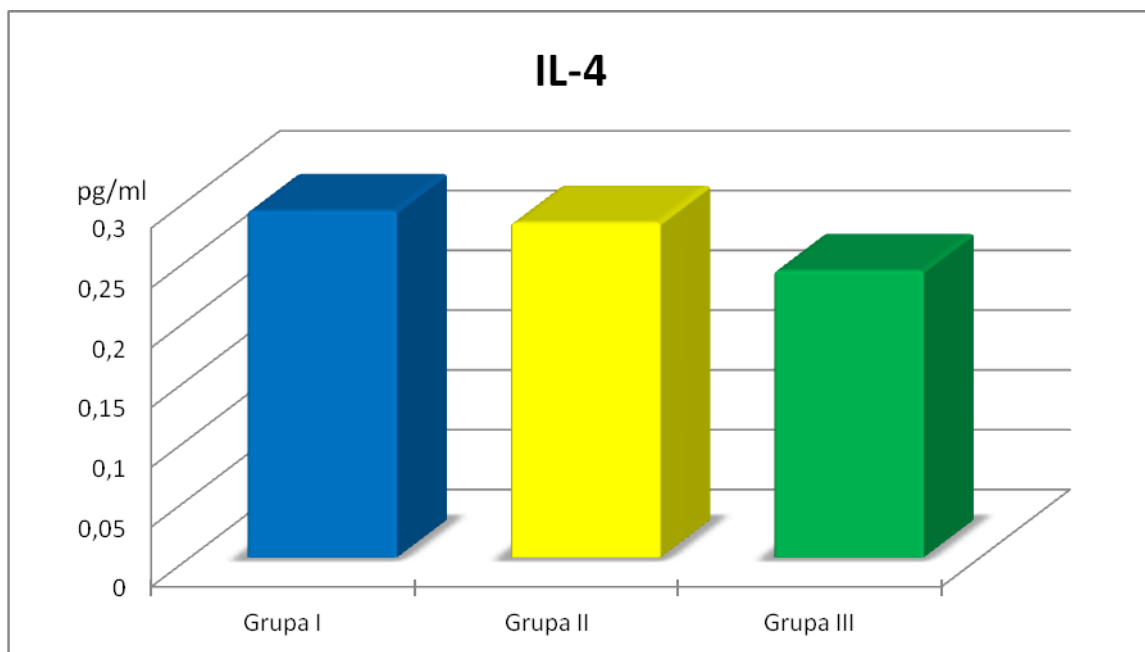
\* oznaczono różnicę statystycznie istotną względem grupy kontrolnej ( $p<0,05$ ).



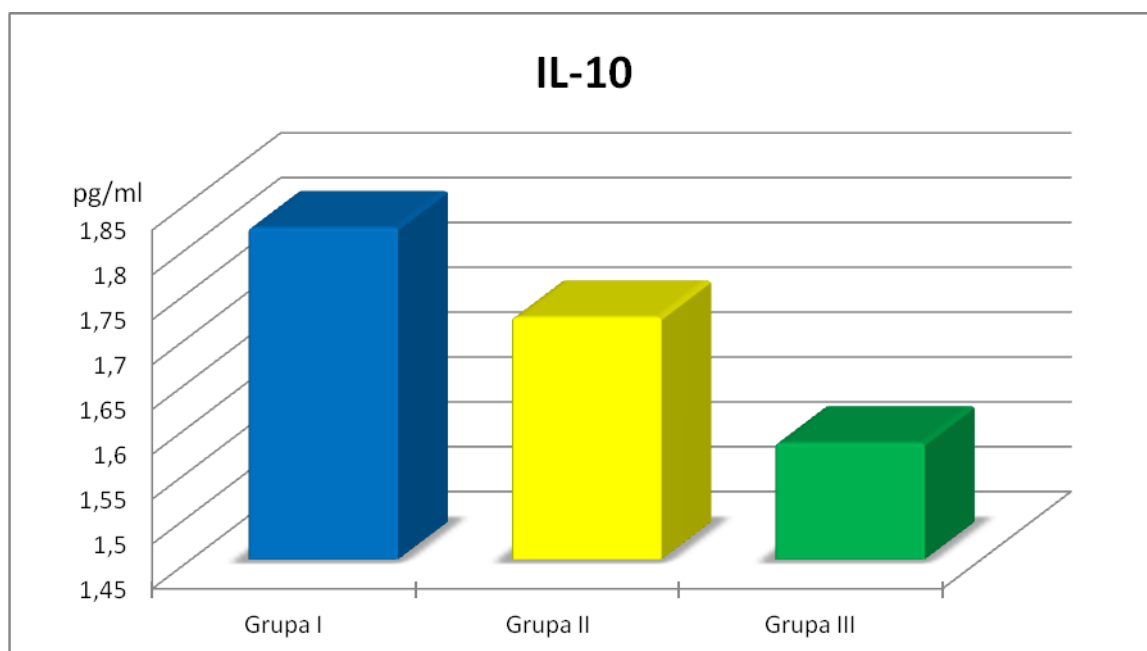
**Ryc. 9.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów TGF-β1 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III)



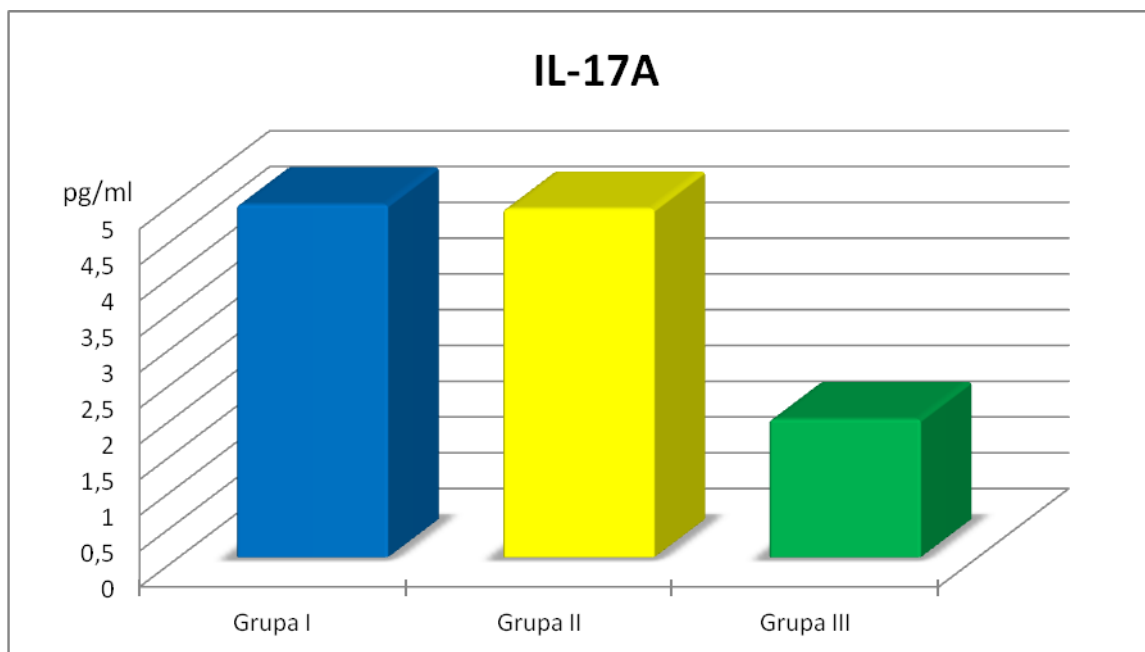
**Ryc. 10.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IFN-γ u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).



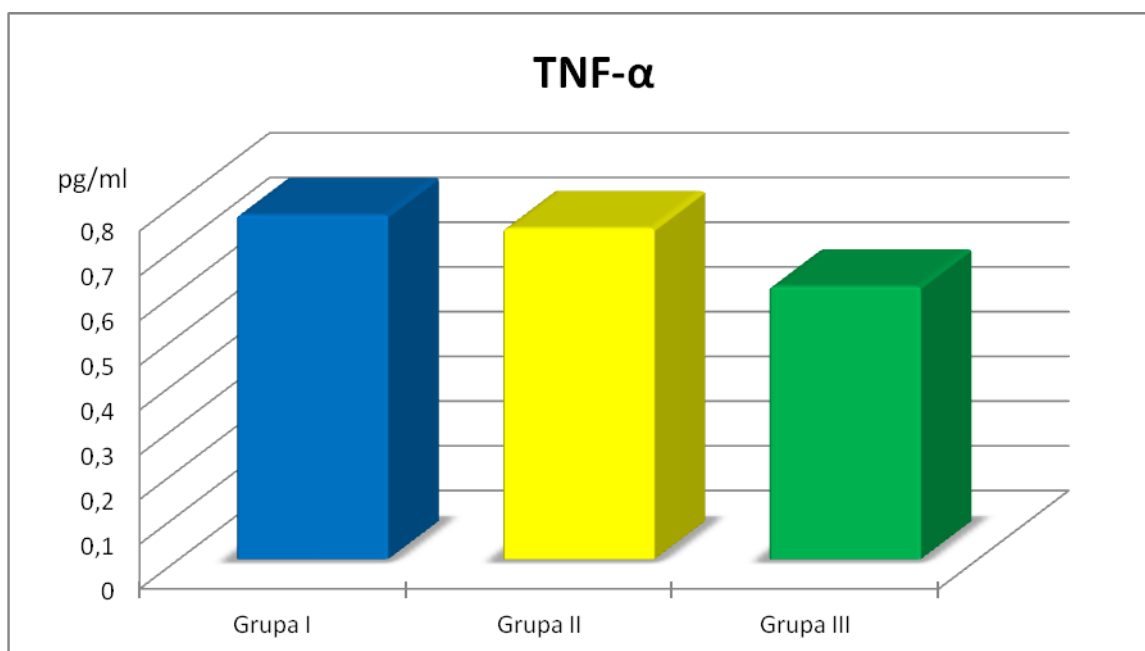
**Ryc. 11.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-4 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).



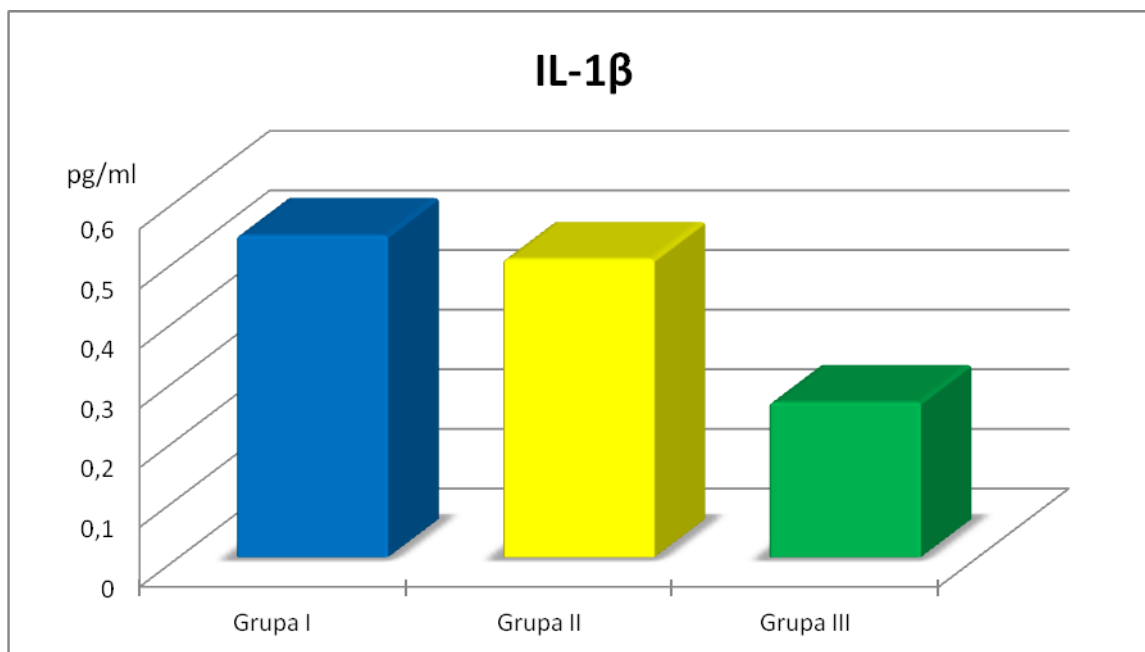
**Ryc. 12.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-10 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).



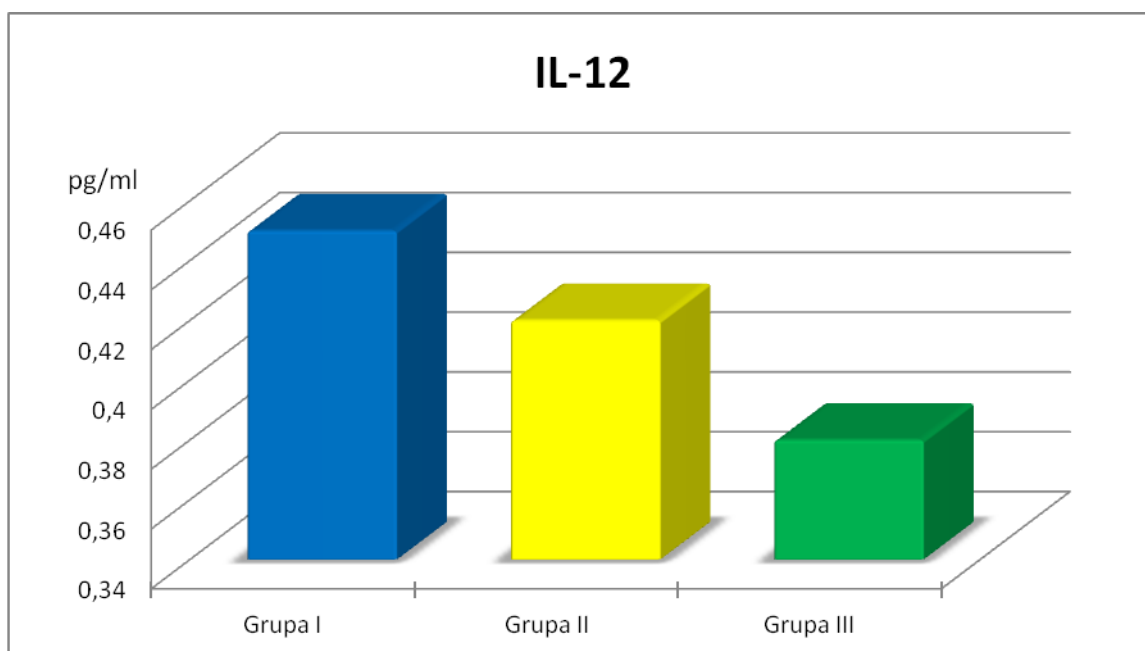
**Ryc. 13.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-17A u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).



**Ryc. 14.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów TNF-α u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).



**Ryc. 15.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-1 $\beta$  u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).



**Ryc. 16.** Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-12 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).

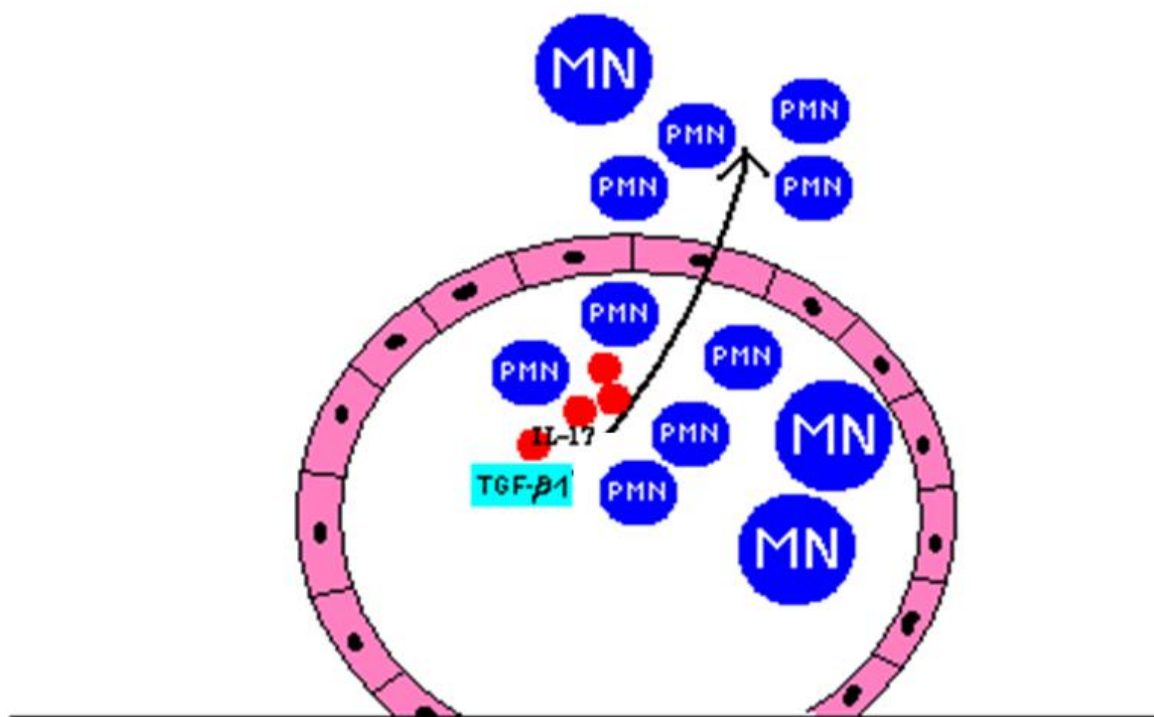
## V. DYSKUSJA

W niniejszej pracy zanalizowano na podstawie przeprowadzonych badań poziomy krążących cytokin wytwarzanych przez subpopulacje limfocytów Th, monocytów/makrofagów i komórek epitelialnych u chorych z przewlekłymi zakażeniami *S. aureus*, a także dystrybucję grup specyficzności agr oraz lekowrażliwość wśród izolowanych klinicznych szczepów *S. aureus*.

Transformujący czynnik wzrostu- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), wytwarzany głównie przez pobudzone limfocyty T i makrofagi wywiera wpływ na procesy proliferacji i różnicowania komórek oraz wykazuje silne działanie immunomodulacyjne. Cytokina ta charakteryzuje się działaniem immunosupresyjnym, hamuje pobudzenie i proliferację limfocytów Th1, zmniejsza ilość wydzielanego przez nie czynnika martwicy nowotworów (TNF) i interleukiny 1 (IL-1) [9, 36]. TGF- $\beta$  wpływa na różnicowanie komórek T CD4<sup>+</sup> w limfocyty stanu zapalnego Th17 [106].

IFN- $\gamma$ , głównie produkowany przez aktywowane limfocyty Th1 zapewnia optymalną odpowiedź komórkową, a także silną stymulację monocytów/makrofagów, zwłaszcza fagocytozy i mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania mikroobów [100]. Zdolność ta jest stymulowana przez zwiększenie wytwarzania nadtlenu w granulocytach obojętnochłonnych i makrofagach [6]. Jednak, nadprodukcja tej cytokiny jest związana z rozwojem reakcji zapalnej i autoimmunologicznej organizmu gospodarza, promującej patologię narządową lub układową [95]. Z drugiej strony, IL-4 i IL-10, głównie produkowane przez aktywowane limfocyty Th2 warunkują optymalną odpowiedź humoralną, jednocześnie oddziałując supresyjnie na funkcje komórek Th1, a także monocytów/makrofagów [30]. IL-4 pełni funkcję autokrynną, wpływając na różnicowanie dziewiczych komórek T CD4<sup>+</sup> do Th2. IL-4 indukuje wydzielanie cytokin prozapalnych, jest zaangażowana w tworzenie ogniska zapalnego. Przyczynia się do powstawania limfocytów T cytotoksycznych. IL-10 w szerokim zakresie osłabia odpowiedź komórkową i hamuje odpowiedź zapalną [73]. Supresorowe działanie IL-10 na różnicowanie komórek T CD4<sup>+</sup> polega na zmniejszaniu liczby komórek T, ograniczeniu migracji makrofagów, oraz obniżeniu poziomu wydzielania TNF i IL-12 przez monocyty [106]. IL-10 ma istotne znaczenie dla proliferacji i różnicowania limfocytów B. Z kolei IL-17, głównie wytwarzana przez aktywowane limfocyty Th17, jest pro-zapalną cytokiną, odgrywającą istotną rolę w indukcji lokalnej oraz ogólnej reakcji immunologicznej, przede wszystkim rekrutując neutrofile wobec patogenów [8]. Plejotropowe oddziaływanie IL-17 na liczne komórki, jej zdolność do indukcji ekspresji wielu

mediatorów reakcji zapalnej między innymi neutrofilami, makrofagami oraz fibroblastami, komórkami endotelialnymi i mezotelium, sprawia iż pełni ona rolę mediatora odpowiedzi zapalnej. Klasyczne, pro-zapalne cytokiny, TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-12, głównie produkowane przez aktywowane monocyty/makrofagi, a także przez komórki epitelialne charakteryzują się szeroką immunostymulacyjną aktywnością i jednocześnie kooperują z IL-17 w indukcji odpowiedzi zapalnej organizmu [105].



**Ryc. 17.** Schemat prezentujący udział IL-17 w indukcji odczynu zapalnego w przewlekłym zakażeniu *S. aureus*.

IL-17 promuje odczyn zapalny zapewniając migrację granulocytów (PMN) oraz monocytów (MN) do ogniska zapalnego. To działanie wspomaga również TGF- $\beta$ 1, który jednak nie ulega zwiększeniu u badanych chorych, co oznacza, że nie bierze udziału w indukcji odczynu zapalnego (Ryc. 17).

W przeprowadzonych badaniach wykazano zwiększone poziomy krążących cytokin: IFN- $\gamma$  i IL-17A, przy koncentracjach TGF- $\beta$ 1, IL-4 i IL-10 pozostających w zakresie wartości prawidłowych u pacjentów z przewlekłymi zakażeniami *S. aureus*, manifestujących się przewlekłą ropną chorobą skóry lub przewlekłym zapaleniem górnych dróg oddechowych. Uzyskane rezultaty wskazują na występującą odpowiedź limfocytów Th1/Th17, przy upośledzonej indukcji komórek Th2 w przebiegu przewlekłego zakażenia



*S. aureus*. Wniosek ten częściowo mogą wspierać badania *in vitro* prezentowane w pracach Breuer i wsp. [11] i ostatnio Niebuhr i wsp. [78] wykazujące, że  $\alpha$ -toksyna, będąca 33-KDa cytolizyną uwalniana przez *S. aureus*, indukuje sekrecję IFN- $\gamma$  i IL-17 przez ludzkie komórki CD4<sup>+</sup> T. Jednocześnie stwierdzono, że gronkowcowy peptydoglikan (PGN) za pośrednictwem komórek dendrytycznych (DC) wywołuje odpowiedź Th1/Th17 [39]. Ponadto, wzrost odsetka komórek Th1 i Th17 w krwi obwodowej opisano u ludzi w chorobach skóry, w atopowym zapaleniu skóry [59] i łuszczycy [69]. Obecnie, oprócz linii limfocytów Th1 i Th17, także wyróżnia się komórki o mieszanym fenotypie Th17/Th1, które łącznie wykazują aktywność komórek Th17 i Th1, charakteryzując się produkcją zarówno IL-17, jak i IFN- $\gamma$  [1]. Komórki Th17/Th1 charakteryzują się stabilną koekspresją czynników transkrypcyjnych T-bet i ROR $\gamma$ t, najprawdopodobniej wywodzą się z limfocytów Th17 i występują w bardzo niskim odsetku populacji krążących limfocytów T CD4<sup>+</sup> w krwi obwodowej osób zdrowych, stanowiąc tylko 0.05-0.11% [53, 65]. W kontekście tych danych, stwierdzony wzrost poziomów IFN- $\gamma$  i IL-17A w surowicach pacjentów może być rezultatem preferencyjnej indukcji i akumulacji populacji komórek Th17/Th1 w wywoływanych zakażeniem *S. aureus* w ogniskach zapalnych skóry lub śluzówki górnych dróg oddechowych. Aktywność sekrecyjna tych komórek prawdopodobnie jest związana z rozwojem przewlekłego procesu zapalnego wywoływanego zakażeniem *S. aureus*. Możliwość tę uprawdopodobniają badania *in vitro* Boniface i wsp. [8] wykazujące, że w odróżnieniu od ludzkich limfocytów Th1 lub Th17, komórki Th17/Th1 charakteryzują się silniejszymi właściwościami indukcji stanu zapalnego. Z drugiej strony, Cho i wsp. [22] w badaniach na modelu mysim, demonstrowali, że IL-17 promując rekrutację neutrofilii, jest konieczna dla skutecznej obrony organizmu gospodarza wobec gronkowcowego zakażenia skóry. Stwierdzony 2,5-krotny wzrost poziomów krążącej IL-17A u chorych, zatem nie jest wystarczający do indukcji adekwatnej odpowiedzi wobec zakażenia *S. aureus*, natomiast może synergistycznie z równocześnie uwalnianym IFN- $\gamma$  rozwijać przewlekły proces zapalny. W niniejszej pracy wykazano u chorych 2-krotne zwiększenie poziomów krążącego IFN- $\gamma$ , któremu jednak nie towarzyszył wzrost krążących poziomów TNF- $\alpha$  i IL-12. Z kolei, wykryty wzrost poziomów krążącej IL-1 $\beta$ , może być efektem sekrecji tej cytokiny przez stymulowane IFN- $\gamma$  komórki endothelium naczyniowego [8, 105]. Stwierdzone zatem zwiększone poziomy IFN- $\gamma$  nie są wystarczające do skutecznej indukcji funkcji sekrecyjnej monocytów/makrofagów, a zwłaszcza komórek epitelialnych. Wniosek ten częściowo mogą wspierać badania Minegishi i wsp. [75], dokumentujące słabą odpowiedź sekrecyjną komórek epitelialnych wobec IFN- $\gamma$ . Ponadto, powyżej cytowani autorzy wykazali, że efektywność

odpowiedzi keratynocytów i komórek nabłonka oskrzelowego, włączając sekrecję chemokin i przeciwdrobnoustrojowych peptydów jest silnie zależna od synergistycznego działania IL-17 i innych cytokin pro-zapalnych (TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$  + IFN- $\gamma$ ).

Tak więc, w zakażeniu *S. aureus* skóry lub górnych dróg oddechowych może dochodzić do preferencyjnej indukcji i akumulacji komórek Th17/Th1, co przy niedostatecznej odpowiedzi cytokinowej monocytów/makrofagów, a zwłaszcza keratynocytów lub nabłonka oskrzelowego, promuje rozwój przewlekłego procesu zapalnego.

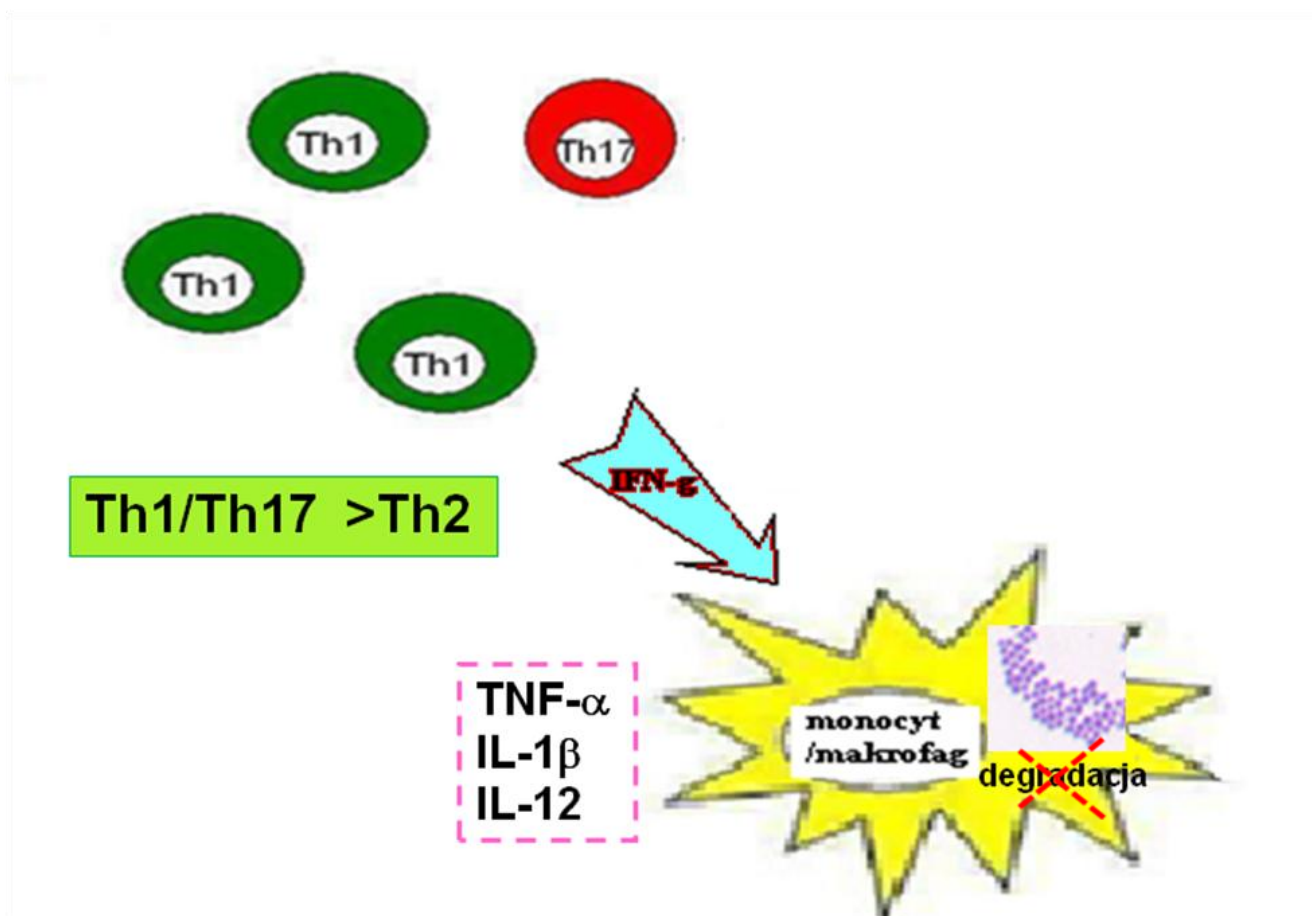
Wśród izolowanych szczepów *S. aureus*, pochodzących zarówno od chorych z przewlekłą ropną chorobą skóry, jak i z zapaleniem górnych dróg oddechowych wykazano istotną dominację grupy specyficzności IV agr, podczas gdy dystrybucja pozostałych grup specyficzności agr nie różniła się statystycznie. Dominacja grupy specyficzności IV agr u szczepów izolowanych od chorych w Polsce, głównie z zakażeniami ropnymi opisano także wcześniej [40]. Ponadto stwierdzono, że szczepy grupy specyficzności IV agr rzadko występują wśród zdrowych nosicieli *S. aureus* [23, 40]. Opisano także związek szczepów *S. aureus* należących do grupy specyficzności IV agr z produkcją toksyn epidermolitycznych (exfoliatyn – ET) i filogenetyczną grupą AF1 w odróżnieniu od AF2 związanej ze szczepami grupy I i II agr, i AF3 związanej ze szczepami grupy III agr [49]. Jednak, w tej pracy u żadnego z badanych pacjentów nie rozpoznano uogólnionej lub zlokalizowanej postaci gronkowcowego zespołu oparzonej skóry - staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) wywoływanego ET [96]. Te dane kliniczne wskazują zatem, że izolowane od chorych szczepy *S. aureus* nie produkowały ET. Ponadto, w surowicach badanych chorych poziomy IFN- $\gamma$ , IL-17A i IL-1 $\beta$  nie były znacznie wysokie, a koncentracje TNF- $\alpha$  pozostawały w zakresie wartości prawidłowych. Dobrze już wiadomo, że toksyny uwalniane przez *S. aureus*: enterotoksyny, toksyna-1 zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1) i ET wykazują aktywność superantygenów w oddziaływaniu na układ odpornościowy [77]. Rezultatem tej aktywności są więc niezwykle wysokie poziomy krążących różnych cytokin włączając TNF- $\alpha$  [86].

Lekooporność u badanych szczepów pochodzących od chorych z przewlekłymi ropnymi chorobami skóry oraz od chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (typu rhinopharyngitis) charakteryzowała się w większości metycylinowrażliwością z wyjątkiem 5 szczepów MRSA. Oporność na trimetoprim/ sulfametoksazol stwierdzono tylko u 1 chorego z zakażeniem górnych dróg oddechowych.

Analizując występowanie grup specyficzności agr, wykazano dominację grupy IV u izolowanych szczepów *S. aureus*. Wydaje się więc możliwym, że ten fenotyp agr jest

szczególnie powiązany z aktywacją ekspresji czynników wirulencji, co warunkuje jego preferencyjny związek z patogennością *S. aureus*.

Tak więc na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników można wnioskować, że u chorych z zakażeniami *S. aureus*, manifestującymi się przewlekłą ropną chorobą skóry lub przewlekłym zapaleniem górnych dróg oddechowych występuje odpowiedź cytokinowa Th17/Th1, której nie towarzyszy dostateczna odpowiedź pro-zapalna monocytów/makrofagów i komórek epitelialnych. Możliwym jest zatem, że limfocyty Th17/Th1 są odpowiedzialne za promocję przewlekłego procesu zapalnego *S. aureus*. Jednocześnie wykazano, że wśród chorych dominują szczepy należące do klasy IV agr, co wskazuje na preferencyjny jej związek z patogennością *S. aureus*.



**Ryc. 18.** Schemat prezentujący odpowiedź cytokinową u pacjentów z przewlekłym zakażeniem *S. aureus*.

W zakresie odpowiedzi cytokinowej uzyskano wzrost poziomu IFN- $\gamma$  i IL-17, co oznacza wzrost przewagi limfocytów Th1 i Th17 nad limfokinami Th2. Jednocześnie nie dochodzi do odpowiedzi monocytów i makrofagów, ponieważ wartości limfokin prozapalnych nie ulegają zwiększeniu. Następstwem może być brak zabijania wewnątrzkomórkowego sfagocytowanych gronkowców (Ryc. 18).

## VI. WNIOSKI

1. Szczepy *S. aureus* związane z przewlekłą ropną chorobą skóry lub przewlekłym zapaleniem górnych dróg oddechowych najczęściej są wrażliwe na metycylinę (szczepy MSSA) oraz trimetoprim/sulfametoksazol.
2. Dominującą grupą specyficzności genów regulatorowych *agr* wśród izolowanych szczepów klinicznych *S. aureus* jest grupa *agr-IV*, co wskazuje na preferencyjny jej związek z patogennością *S. aureus*.
3. W zakażeniach *S. aureus*, manifestujących się przewlekłą chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych, nie ulega zwiększeniu surowiczy poziom TGF- $\beta$ 1, czego następstwem może być ograniczona indukcja odczynu zapalnego.
4. W zakażeniach *S. aureus*, manifestujących się przewlekłą chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych, występuje odpowiedź cytokinowa Th1/Th17, co wydaje się determinować przewlekły proces zapalny.
5. Rozwój przewlekłego zakażenia *S. aureus*, manifestującego się przewlekłą chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych, wydaje się być związany z upośledzoną odpowiedzią cytokinową monocytów/makrofagów.

## VII. STRESZCZENIE

### WSTĘP

*Staphylococcus aureus* – gronkowiec złocisty należy do najczęstszych gatunków bakterii wywołujących zakażenia szpitalne i pozaszpitalne u ludzi, które zwykle manifestują się ropną chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych. Antybiotykoterapia tych stanów zapalnych jest często nieskuteczna, występuje nawrotowość choroby, związana z przetrwałym zakażeniem *S. aureus*. Rola reakcji odpornościowej w patogenezie przewlekłych zakażeń *S. aureus* nadal nie jest jasna. Z kolei, chorobotwórczość *S. aureus* jest determinowana wytwarzaniem wielu czynników wirulencji, które u tego patogenu podlegają kontroli przez system globalnej regulacji - Agr (accessory gene regulator). Na podstawie polimorfizmu genów agr, wyróżnia się 4 główne grupy specyficzności: agr-I, agr-II, agr-III i agr-IV. Biorąc pod uwagę powyższe, celem pracy było zanalizowanie występowania grup specyficzności agr wśród szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych z przewlekłymi zakażeniami *S. aureus* w kontekście odpowiedzi cytokinowej.

Dla realizacji powyższego celu przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Dokonanie oceny lekowrażliwości szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z przewlekłymi ropnymi chorobami skóry oraz od chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych.
2. Dokonanie oceny występowania grup specyficzności agr u szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z przewlekłymi ropnymi chorobami skóry oraz od chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych.
3. Ocena poziomów transformującego czynnika wzrostu- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) w surowicach badanych chorych.
4. Ocena poziomów cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 i IL17A w surowicach badanych chorych.

5. Ocena poziomów cytokin prozapalnych wytwarzanych przez monocyty/makrofagi: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 w surowicach badanych chorych.

## **MATERIAŁY I METODY**

Badania obejmowały 3 grupy dorosłych pacjentów: grupa 1 licząca 50 pacjentów z przewlekłą ropną chorobą skóry związaną z zakażeniem *S. aureus*, grupa 2 licząca 40 pacjentów z przewlekłym zakażeniem górnych dróg oddechowych związanym z zakażeniem *S. aureus* oraz grupa 3 – kontrolna licząca 25 zdrowych osób.

Metody badań: bakteriologiczne (izolacja i identyfikacja *S. aureus* oraz oznaczanie lekowrażliwości), molekularne (PCR) dla identyfikacji grup specyficzności agr, oznaczanie cytokin w surowicy krwi (technika ELISA – HS wysokiej czułości).

## **WYNIKI**

Od wszystkich chorych grupy 1 i 2 izolowano szczepy *S. aureus*. Jednocześnie szczepy te charakteryzowały się w większości metycylinowrażliwością (szczepy MSSA) z wyjątkiem 5 szczepów opornych. W niniejszej pracy stwierdzono 2,5 krotny wzrost poziomów krążącej IL-17A u badanych chorych, która nie jest wystarczająca do indukcji adekwatnej odpowiedzi wobec zakażenia *S. aureus*, natomiast może synergistycznie z równocześnie uwalnianym IFN- $\gamma$  rozwijać przewlekły proces zapalny. Ponadto, wykazano u chorych 2-krotne zwiększenie poziomów krążącego IFN- $\gamma$ , któremu jednak nie towarzyszył wzrost krążących poziomów TNF- $\alpha$  i IL-12. Koncentracje TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-4 oraz IL-10 pozostawały w zakresie wartości prawidłowych.

W grupach badanych pacjentów wykazano istotną dominację grupy specyficzności IV agr; występująca u 58% szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych z przewlekłą chorobą skóry i 65% szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych z zapaleniem górnych dróg oddechowych.

## **WNIOSKI**

1. Szczepy *S. aureus* związane z przewlekłą ropną chorobą skóry lub przewlekłym zapaleniem górnych dróg oddechowych najczęściej są wrażliwe na metycylinę (szczepy MSSA) oraz trimetoprim/sulfametoksazol.

2. Dominującą grupą specyficzności genów regulatorowych *agr* wśród izolowanych szczepów klinicznych *S. aureus* jest grupa agr-IV, co wskazuje na preferencyjny jej związek z patogennością *S. aureus*.
3. W zakażeniach *S. aureus*, manifestujących się przewlekłą chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych, nie ulega zwiększeniu surowiczy poziom TGF- $\beta$ 1, czego następstwem może być ograniczona indukcja odczynu zapalnego.
4. W zakażeniach *S. aureus*, manifestujących się przewlekłą chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych, występuje odpowiedź cytokinowa Th1/Th17, co wydaje się determinować przewlekły proces zapalny.
5. Rozwój przewlekłego zakażenia *S. aureus*, manifestującego się przewlekłą chorobą skóry lub zapaleniem górnych dróg oddechowych, wydaje się być związany z upośledzoną odpowiedzią cytokinową monocytów/makrofagów.



## VIII. SUMMARY

**“Evaluation of cytokine response in adults affected by chronic infections with *Staphylococcus aureus*”**

### INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* belongs to the most frequent bacterial species which induce hospital and extra-hospital infections. In humans, usually manifested by a suppurative dermal disease or infection in the upper respiratory tract. Antibiotic therapy of such inflammatory conditions is frequently ineffective; relapses of the disease occur, associated with persisting *S. aureus* infection. The role of immune reaction in pathogenesis of chronic *S. aureus* infections remains unclear. In turn, pathogenicity of *S. aureus* is determined by production of several virulence factors, which is his pathogen remain under control of the global regulator system - Agr (accessory gene regulator). On the basis of agr gene polymorphism four main groups of specificities are distinguished, including agr-I, agr-II, agr-III and agr-IV. Taking into account the above this study aimed at analysis of agr specificity groups manifestation among strains of *S. aureus* isolated from patients with chronic *S. aureus* infections in the context of host cytokine response.

The goal was implemented accepting the following investigative aims:

1. Determination of drug sensitivity of *S. aureus* strains isolated from patients with chronic suppurative dermatitis and from patients with chronic infections in the upper respiratory tract.
2. Evaluation of agr specificity group manifestation in strains of *S. aureus* isolated from patients with chronic suppurative dermatitis and from patients with chronic inflammations in the upper respiratory tract.
3. Evaluation of levels manifested by transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in sera of studied patients.
4. Evaluation of cytokine levels produced by Th lymphocytes, including IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL17A in sera of studied patients.

5. Evaluation of pro-inflammatory cytokine levels produced by monocytes/macrophages, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-12 in sera of studied patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

The studies included 3 groups of adult patients: group 1 of 50 patients with chronic suppurative dermatitis linked to infection with *S. aureus*, group 2 of 40 patients with chronic infection in the upper respiratory tract linked to infection with *S. aureus* and group 3, the control group of 25 healthy individuals.

Methods of studies included bacteriological investigations (isolation and identification of *S. aureus* and determination of its drug sensitivity), molecular studies (PCR) aimed at identification of agr specificity groups, determination of cytokine levels in serum (ELISA – HS technique of high sensitivity).

## **RESULTS**

Strains of *S. aureus* were isolated from all patients of groups 1 and 2. Most of the strains manifested methicillin sensitivity (MSSA strains) with the exception of 5 resistant strains. In the studied patients 2.5-fold increase in levels of circulating IL-17A was documented, which was not sufficient for induction of an adequate response to *S. aureus* infection but which could develop chronic inflammation acting synergistically with the released IFN- $\gamma$ . Moreover, the patients manifested a two-fold increase in levels of circulating IFN- $\gamma$ , which, however, was not accompanied by increased levels of circulating TNF- $\alpha$  and IL-12. Concentrations of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 remained within the normal ranges.

In the groups of studied patients a significant dominance was documented of the IV agr specificity group, accounting for 58% *S. aureus* strains isolated from patients with chronic dermatitis and 65% *S. aureus* strains isolated from patients with chronic inflammation in the upper respiratory tract.

## **CONCLUSIONS**

1. *S. aureus* strains linked to chronic dermatitis or chronic inflammation in the upper respiratory tract are most frequently sensitive to methicillin (MSSA strains) and to trimethoprim/sulfamethoxazole.

2. Clinical isolates of *S. aureus* strains manifest prevalence of agr-IV group of agr regulatory gene specificities, which points to its preferential link to pathogenicity of *S. aureus*.
3. Infections with *S. aureus*, manifested by chronic dermatitis or inflammation in the upper respiratory tract are not accompanied by an increased serum levels of TGF- $\beta$ 1, possibly resulting in a reduced induction of inflammatory reaction.
4. In *S. aureus* infections manifested by chronic dermatitis or inflammation in the upper respiratory tract Th1/Th17 cytokine response develops, which seems to determine the chronic inflammatory process.
5. Development of a chronic *S. aureus* infection, manifested by chronic dermatitis or inflammation in the upper respiratory tract, seems to be linked to an impoverished cytokine response of monocytes/macrophages.

## IX. WYKAZ TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

### 8.1. Tabele

strona

- Tab. 1. Zestawienie liczbowe analizy lekooporności u izolowanych szczepów S. aureus.* 32
- Tab. 2. Zestawienie występowania grup specyficzności agr wśród badanych szczepów S. aureus u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).* 34
- Tab. 3. Analiza statystyczna poziomu istotności pomiędzy grupami agr u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II).* 35
- Tab. 4. Zestawienie wyników surowiczego TGF –  $\beta$ 1 wraz z analizą statystyczną u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) i w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).* 36
- Tab. 5. Zestawienie wyników badanych cytokin wraz z analizą statystyczną (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17A) u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) i u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).* 37
- Tab. 6. Zestawienie wyników badanych cytokin oraz analiza statystyczna (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12) u chorych z zakażeniami skóry (grupa I) i u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).* 38
- Tab. 7. Analiza statystyczna poziomu cytokin (TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12) w surowicach chorych w z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz w surowicach chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III).* 41

### 8.2. Ryciny

- Ryc. 1. Odpowiedź cytokinowa indukowana antygenami patogenów [22, 107].* 6
- Ryc. 2. Klony MRSA [51, 61].* 11
- Ryc. 3. Zmodyfikowany schemat funkcjonowania systemu agr u Staphylococcus aureus [49, 52, 72].* 16

- Ryc. 4. Graficzne przedstawienie lekooporności badanych szczepów *S. aureus* w grupie chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II). 33
- Ryc. 5. Graficzne przedstawienie występowania grup specyficzności agr wśród badanych szczepów *S. aureus* u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) oraz u chorych z zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II). 34
- Ryc. 6. Graficzne przedstawienie średnich wartości poziomów badanych cytokin (pg/ml) w grupie chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I). 38
- Ryc. 7. Graficzne przedstawienie średnich wartości poziomów badanych cytokin (pg/ml) w grupie chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych związanymi z zakażeniem *S. aureus* (grupa II). 39
- Ryc. 8. Graficzne przedstawienie średnich wartości poziomów badanych cytokin (pg/ml) w grupie kontrolnej (grupa III). 39
- Ryc. 9. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów TGF- $\beta$ 1 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III) 42
- Ryc. 10. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IFN- $\gamma$  u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 42
- Ryc. 11. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-4 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 43
- Ryc. 12. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-10 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 43
- Ryc. 13. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-17A u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 44

Ryc. 14. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów TNF- $\alpha$  u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 44

Ryc. 15. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-1 $\beta$  u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 45

Ryc. 16. Graficzne przedstawienie wartości średnich poziomów IL-12 u chorych z przewlekłymi chorobami ropnymi skóry (grupa I) i chorych z przewlekłymi zakażeniami górnych dróg oddechowych (grupa II) oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych (grupa III). 45

Ryc. 17. Schemat prezentujący udział IL-17 w indukcji odczynu zapalnego w przewlekłym zakażeniu *S. aureus*. 47

Ryc. 18. Schemat prezentujący odpowiedź cytokinową u pacjentów z przewlekłym zakażeniem *S. aureus*. 50

### **8.3. Fotografie**

- Fot. 1. *Staphylococcus aureus* preparat barwiony metodą Grama. 8
- Fot. 2. Wzrost *S. aureus* na agarze z krwią. 12
- Fot. 3. Wzrost *S. aureus* na podłożu Chapmana. 13
- Fot. 4. *S. aureus* preparat barwiony metodą Grama. 13
- Fot. 5. Test szkiełkowy koagulaza związana CF (clumping factor). 14
- Fot. 6. Test probówkowy koagulaza wolna. 14
- Fot. 7. Api ID 32 Staph (bioMerieux). 15
- Fot. 8. Slidex MRSA Detection (bioMerieux), aglutynacja lateksu. 15

## X. PIŚMIENICTWO

1. Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F. and Napolitani G.: Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 639-46.
2. Adorini L.: Cytokine-based immunointervention in the treatment of autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 132: 185–192.
3. Ben Ayed S., Boutiba-Ben Boubaker I., Samir E. Prevalence of agr specificity groups among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2006; 54: 8-9.
4. Benito Y., Kolb F.A., Romby P., Lina G., Etienne J., Vandenesch F.: Probing the structure of RNA III, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA*. 2000; 6: 668-679.
5. Berk D.R., Bayliss S.J.: MRSA, Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, and Other Cutaneous Bacterial Emergencies. *Pediatric Annals*. 2010; 39 (10): 627–633.
6. Billiau A., Matthys P.: Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20: 97-113.
7. Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C.: Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 749-795.
8. Boniface K., Blumenschein W.M., Brovont-Porth K., McGeachy M.J., Basham B., Desai B., Pierce R., McClanahan T.K., Sadekova S. and de Waal Malefyt R.: Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN- $\gamma$ -producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. *J. Immunol.* 2010, 185, 679-687.
9. Border W.A., Noble N.A.: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 1286–1290.
10. Boucher H.W., Corey G.R.: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 1;46, Suppl. 5, 344-349.

11. Breuer K., Wittmann M., Kempe K., Kapp A., Mai U., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Mrabet-Dahbi S., Werfel T.: Alpha-toxin is produced by skin colonizing *Staphylococcus aureus* and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. Clin. Exp. Aller. 2005; 35: 1088-1095.
12. Broekema N. M., T. T. Van, T. A. Monson, S.A. Marshall, D. M. Warshauer.: Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA* mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. J. Clin. Microbiol. 2009; 47: 217-219.
13. Bronner S., Monteil H., Prevost G.: Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microb. Rev. 2004; 28: 183-200.
14. Buck M.B., Fritz P., Dippon J., Zugmaier G., Knabbe C.: Prognostic significance of TGF- $\beta$  receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. Clin. Cancer Res. 2004; 10: 491–498.
15. Cambien F., Ricard S., Troesch A., Mallet C., Generenaz L., Evans A., Arveiler D., Luc G., Ruidavets J.B., Poirier O.: Polymorphisms of the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. Hypertension. 1996; 28: 881–887.
16. Caserta T.M., Knisley A.A., Tan F.K., Arnett F.C., Brown T.L.: Genotypic analysis of the TGF  $\beta$  -509 allele in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. Ann. Genet. 2004; 47: 359–363.
17. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. MMWR, 2002; 51 (26): 565-567.
18. CDC. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. MMWR, 1997; 46 (33): 765.
19. Cerreti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B. i wsp.: Molecular cloning of the interleukin – 1 beta converting enzyme. Science. 1992; 256: 97-100.
20. Chambers H.F.: The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:178-182.



21. Chmiel D., Mickowska B.: Systemy regulatorowe *agr* i *sar* u *Staphylococcus aureus*. Postępy Biol. Komórki. Tom 29, 2002; 1: 103-120.
22. Cho J.S., Pietras E.M., Garcia N.C., Ramos R.I., Farzam D.M., Monroe H.R., Magorien J.E., Blauvelt A., Kolls J.K., Cheung A.L., Cheng G., Modlin R.L. and Miller L.S.: Il-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. J. Clin. Invest. 2010, 120, 1762-1773.
23. Collery M.M., Smyth D.S., Twohig J.M., Shore A.C., Coleman D.C., Smyth C.J.: Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. Jurnal of Microbiol. 2008; 57: 348-358.
24. Collins J.T., Dunnick W.A.: Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. Int. Immunol. 1993; 5: 885-891.
25. Colombo M.P., Trinchieri G.: Interleukin 12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. Cytokine Growth Factor. 2002; 13: 155-168.
26. Crown J., Jakubowski A., Gabilove J.: Interleukin-1: biological effects in human hematopoiesis. Leuk. Lymph. 1993; 9: 433-440.
27. Deurenberg R.H., Stobberingh E.E.: The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect. Genet. Evol. 2008 Dec; 8(6):747-63.
28. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.: Exotoksins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13: 16-34.
29. Dzierżanowska D., Murawska B.: Rola metycylinoopornych gronkowców (MRSA) w zakażeniach szpitalnych. Terapia. 1998; 9: 16-19.
30. Elaine Y., Chung et al.: "Interleukin-10 Expression in Macrophages during Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Mediated by Homeodomain Proteins Pbx1 and Prep-1", Immunity. 2007; Vol 27, 952-964.
31. ETM, Etest Technical Manual. [www.abbiobios.com](http://www.abbiobios.com)

32. Feinberg M.W., Jain M.K.: Role of transforming growth factor- $\beta$ /Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis. *Panminerva Med.* 2005; 47: 169–86.
33. Ferens W.A., Davis W.C., Hamilton M.J., Park Y.H., Deobald C.F., Fox L., Bohach G.: Activation of bovine lymphocyte subpopulation by staphylococcal enterotoxin. *C. infect. Immunol.* 1998; 66: 573 – 580.
34. Fijałkowski K., Czernomysy – Furowicz D., Ferlas M.: *Staphylococcus aureus* kontra układ immunologiczny. *Postępy Mikrobiol.* 2008; 47, 2: 497 – 501.
35. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.J.: Gram-positive pathogens. 2000; ASM PRESS Washington, D.C.
36. Fitzpatrick D.R., Bielefeldt-Ohmann H.: Transforming growth factor  $\beta$  in infectious disease: always there for host and the pathogen. *Trends Microbiol.* 1999; 7: 232-236.
37. Flanders K.C., Burmester J.K.: Medical applications of TGF- $\beta$ . *Clin. Med. Res.* 2003; 1: 13–20.
38. Foster T. J., Hook M.: Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 484 – 488.
39. Frodermann V., Chau T.A., Sayedyahosseini S., Toth J.M., Heinrichs E., Madrenas J.: A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2011, 204, 253-62.
40. Garbacz K., Piechowicz L., Wiśniewska K., Dąbrowska-Szponar M.: Zróźnicowanie locus *agr* wśród *Staphylococcus aureus* izolowanych od nosicieli oraz od chorych z objawami zakażenia. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2009; 61: 5-9.
41. Guangyong Ji., Beavis R., Novick R.P.: Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science.* 1997; 276: 2027.
42. Hardy K.J., Sawada T.: Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989;170:1021-1026.
43. Hayden M.K., Rezai K., Hayes R.A., Lolans K., Quinn J.P., Weinstein R.A.: Development of daptomycin resistance *in vivo* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 5285-5287.

44. Herold B., Immergluck L.C., Maranan M.C., Lauderdale D.S., Gaskin R.E., Boyle-Vavra S., Leitch C.D., Daum R.S.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. 1998; 279: 593-598.
45. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H. i wsp.: Disamination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant of vancomycin. *Lancet*. 1997; 350 (9092): 1670 – 1673.
46. Horowitz J.C., Lee D.Y., Waghray M., Keshamouni V.G., Thomas P.E., Zhang H., Cui Z., Thannical V.J.: Activation of the prosurvival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by TGF- $\beta$ 1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 1359–1367.
47. Howard M., O’Garra A.: Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today*. 1992; 13: 198–200.
48. Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K.: Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999; 43:1449-1458.
49. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F.: Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles) and human disease. *Infections and Immunity*. 2002; 70 (2): 631-641.
50. Jawetz E., Melnick J.L., Adalberg E.A.: *Przegląd Mikrobiologii Lekarskiej*. PZWL1991.
51. Jevons M.P.: “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br. Med. J*. 1961; 124: 124-125.
52. Ji G., Beavis R.C. Novick R.P.: Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*. 1997; 276: 20027 – 2030.
53. Kagami S., Rizzo H.L., Lee J.J., Koguchi Y. and Blauvelt A.: Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J. Invest. Dermatol*. 2010; 130: 1373-1383.
54. Kaliński P., Smits H.H., Schuitemaker J.H., Vieira P.L., van Eijk M., de Jong E.C., Wierenga E.A., Kapsenberg M.L.: IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human

- Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J. Immunol.* 2000 Aug 15; 165(4): 1877-81.
55. Kaneko J., Kamio Y.: Bacterial two – component and heteroheptameric pore – forming cytotoxic toxins: structures, pore - forming mechanism and organizations of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (68) 2003; 5: 981 – 1003.
  56. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K.: A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:1549-1555.
  57. Kawamura T., Wakusawa R., Inada K.: Interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonists increase during cardiac surgery. *Can. J. Anaesth.* 1997; 44: 38–42.
  58. Kim S.G., Jong H.S., Kim T.Y., Lee J.W., Kim N.K., Hong S.H., Bang Y.J.: TGF- $\beta$ 1 induces apoptosis through Fas ligand – independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15: 420–434.
  59. Koga Ch., Kabashima K., Shiraishi N., Kobayashi M., Tokura Y.: Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2008, 128, 2625-2630.
  60. Kolls J.K., Linden A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity.* 2004 Oct;21(4):467-76.
  61. Kreiswirth B., Kornblum J., Arbeit R.D., Eisner W., Maslow J.N., McGeer A., Low D.E., Novick R.P.: Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* 1993; Vol. 259 no. 5092 pp. 227-230.
  62. Krzemień S., Knapczyk P.: Aktualne poglądy dotyczące znaczenia transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) w patogenezie niektórych stanów chorobowych. *Wiad. Lek.* 2005; 58: 536–539.
  63. Krzysztoń-Russjan J., Hryniewicz W.: Pierwsze izolaty MRSA w Polsce o obniżonej wrażliwości na wankomycynę. Raport Krajowego Ośrodka ds. Lekowrażliwości. 2001 Warszawa
  64. Lee K.Y., Bae S.C.: TGF- $\beta$ -dependent cell growth arrest and apoptosis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002; 35: 47–53.

65. Lexberg M.H., Taubner A., Albrecht I., Lepenies I., Richter A., Kamradt T., Radbruch A. and Chang H.-D.: IFN- $\gamma$  and IL-12 synergize to convert *in vivo* generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 3017-3027.
66. Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S., Robertson A.K., Flavell R.A.: Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 99–146.
67. Liberek A., Marek A., Kmieć Z., Kartanowicz D., Szlagatys-Sidorkiewicz A., Łuczak G., Wierzbicki P.M., Stanisławowski M., Wierzbicki M., Marek K., Liberek T., Sikorska-Wiśniewska G., Góra-Gębka M., Węgrzyn G., Kamińska B.: Rola transformującego czynnika wzrostu  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) w etiopatogenezie i przebiegu klinicznym przewlekłych zapaleń wątroby u dzieci. *Medycyna Wieku Rozwojowego.* 2009; (XIII)3: 163-170.
68. Linden A.: Interleukin-17 and airway remodelling. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2006; 19: 47–50.
69. Lowes M.A., Kikuchi T., Fuentes-Duculan J., Cardinale I., Zaba L.C., Haider A.S., Bowman E.P., Krueger J.G.: Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest. Dermatol.* 2008; 128: 1207-1211.
70. Lowy F.D.: *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 520-532.
71. McManus J.: Vancomycin resistant staphylococcus reported in Hong Kong. *BMJ.* 1999; 318: 626.
72. McNamara P.J., Milligan-Monroe K.C., Khalili S., Proctor R.A.: Identification, Cloning, and Initial Characterization of *rot*, a Locus Encoding a Regulator of Virulence Factor Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(11): 3197-3203.
73. Mege J.L., Meghari S., Honstetter A. et al.: The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.* 2006; 6: 557-569.
74. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – eighth edition. M07-A8, Vol. 29, No. 2 (2009)
75. Minegishi Y., Saito M., Nagasawa M., Takada H., Hara T., Tsuchiya S., Agematsu K., Yamada M., Kawamura N., Ariga T., Tsuge I., Karasuyama H.: Molecular explanation

for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.* 2009, 206, 1291-1301.

76. Moore K.W., Vieira P., Fiorentino D.F. et al.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science.* 1990; 248: 1230-1234.
77. Muller-Alouf H., Carnoy C., Simonet M., Alouf J.E.: Superantigen bacterial toxins: state of the art. *Toxicon.* 2001; 39 (11): 1691-1701.
78. Niebuhr M., Gathmann M., Scharonow H., Mamerow D., Mommert S., Balaji H. and Werfel T.: Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. *Infect. Immun.* 2011, 79, 1615-1622.
79. Niemczyk M., Foronczewicz B., Mucha K.: Rola TGF- $\beta$ . *Pol. Arch. Med. Wew.* 2005; 113: 401–408.
80. Ochoa T.J., Mohr J., Wagner A., Murphy J.R.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11: 966-968.
81. Omoe K., Hu D.L., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Shinagawa K.: Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial Let.* 2005; 246: 191 – 198.
82. Osman A., Niles E.G., LoVerde P.T.: Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad 4: role in Erk-mediated transforming growth factor  $\beta$  down-regulation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 6474–6486.
83. Pardali K., Moustakas A.: Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1775: 21–62.
84. Perussia B.: Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 1991; 3: 49-55.
85. Pricilla D.M. de Matos, Schuenck R.P., Cavalcante F.S., Caboclo R.F.S., Santos K.R.N.: Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCCmec types. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro. 2010; Vol. 105(7): 931-934.

86. Rago J.V., Vath G.M., Bohach G.A., Ohlendorf D.H., Schlievert P.M.: Mutational analysis of the superantigen staphylococcal exfoliative toxin A (ETA). *J. Immunol.* 2000; 15;164(4): 2207-2213.
87. Rice L.B.: The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009 Oct;12(5): 476-81.
88. Rider C.C.: Heparin/heparan sulphate binding in the TGF- $\beta$  cytokine superfamily. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34: 458-460.
89. Robak E., Sysa-Jędrzejowska A., Robak T.: Cytokiny w układowym toczniu rumieniowym. *Przegl. Lek.* 1996; 53: 623-626.
90. Robak T.: Właściwości biologiczne kachektyny (TNF) i jej potencjalna rola w terapii. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 1991; 45: 281-297.
91. Rymarczyk B., Moczulski D., Rogala B., Grzeszczak W.: Analiza polimorfizmu R576Q podjednostki  $\alpha$  receptora dla IL-4 u chorych atopowych. *Alergia Astma Immunologia.* 2000; 5, (3): 188-192.
92. Sakoulas G., Moellering R.C.: Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin. Infect. Dis.*,1;46, 2008; Suppl 5: 360-367.
93. Salgado C.D., Farr B.M., Calfee D.P.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk-factors. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36:131-139.
94. Sands B.E., Kaplan G.G.: The role of TNF-  $\alpha$  in ulcerative colitis. *J.Clin. Pharmacol.* 2007; 47: 930-941.
95. Schroder K, Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A.: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004
96. Shamez L., Joannou C.L., Lochrie D.P., Evans R.W.: Poston S.M. Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999; 12 (2): 224-242.

97. Shopsin B., Mathema B., Alcabes P., Said-Salim B., Lina G., Matsuka A., Martinez J., Kreiswirth B.N.: Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (1): 456–459.
98. Silverman E.S., Palmer L.J., Subramaniam V., Hallock A., Sheeba M., Vallone J., Faffe D.S., Shikanai T., Raby B.A., Weiss S.T., Shore S.A.: Transforming Growth factor- $\beta$ 1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 169: 214–219.
99. Skaar E.P., Schneewind O.: Iron regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus* : stealing iron from heme. *Microbes Infect.* 2004; 6: 390-397.
100. Snapper C.M., McIntyre T.M., Mandler R., Pecanha L.M., Finkelman F.D., Lees A., Mond J.J.: Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J. Exp. Med.* 1992; 175:1367-1371.
101. Srinivasan A., Dick J.D., Perl T.M.: Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 430-438.
102. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D.: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-264.
103. Szewczyk E.M.: Diagnostyka bakteriologiczna. PWN, 2005.
104. Szkaradkiewicz A.: Mikrobiologia lekarska repetytorium z bakteriologii. Wyd. Naukowe UM w Poznaniu, 2011.
105. Szkaradkiewicz A.: Interleukina 1 *in vivo* – aspekty patogenetyczne, zastosowania kliniczne. *Pol. J. Immunol.* 1993; 3: 291-301.
106. Świst K., Pajtasz-Piasecka E.: Wpływ czynników transkrypcyjnych na różnicowanie limfocytów T CD4<sup>+</sup> *Postepy Hig. Med. Dośw.* 2011; 65: 414-426.
107. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A.: Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 2008; 223: 87-113.



108. Trinchieri G.: Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am. J. Pathol.* 1995;147:1534-1538.
109. Tsiordas S., Gold H.S., Sakoulas G.: Linezolid resistance in clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 358: 207-208.
110. Tsuji B.T., Rybak M.J., Sakoulas G.: Evaluation of accessory gene regulator (*agr*) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 5: 1089-1091.
111. Wei X., Messner K.: Age-and injury-dependent concentrations of TGF- $\beta$ 1 and proteoglycan fragments in rabbit knee joint fluid. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998; 6: 10–18.
112. Werner G., Cuny C., Schmitz F.J., Witte W.: Methicillin-resistant, quinupristin/dalfopristin - resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3586-3590.
113. Wertheim H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A. & Nouwen, J.L.: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 2005; 5: 751–762.
114. Winternitz R.: 1898 Ein Beitrag zur Kenntnis der Dermatitis exfoliativa neonatorum (Ritter) *Arch. Dermatol. Syphilis.* 1898; 44: 398 -416.
115. Witowski J., Ksiazek K., Jorres A.: Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61: 567–579.
116. Wójcik K.J., Kowalska M., Kochanik i inni.: Analiza genetyczna szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych od chorych i od zdrowych nosicieli. *Post. Mikrobiol.* 2004; Supl. 43: 191.
117. Yoon H.J., Choi J.Y., Lee K., Yong D., Kim J.M., Song Y.G.: Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. *Yonsei Med. J.* 2007; 48: 176-183.
118. Żabicka D., Hryniewicz W.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2010. Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus spp.* KORLD. s4.