

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

Srovnání diagnostických metod u imunologicky podmíněných kožních chorob

Evaluation of diagnostic methods in immunologically mediated skin diseases

Petra Brodská

Plzeň, 2014

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu dermatovenerologie na Dermatovenerologické klinice LF UK v Plzni.

Uchazeč: MUDr. Petra Brodská
Dermatovenerologická klinika LF UK a FN Plzeň

Školitel: prof. MUDr. Karel Pizinger, CSc.
Dermatovenerologická klinika LF UK a FN Plzeň

Konzultant: prof. MUDr. Petra Cetkovská, Ph.D.
Dermatovenerologická klinika LF UK a FN Plzeň

Oponenti: prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA
Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha

doc. MUDr. Magdalena Skořepová, CSc.
Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu dermatovenerologie se koná dne: 16. 9. 2014

Místo obhajoby: Dermatovenerologická klinika LF UK a FN Plzeň, knihovna 7. patro

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Karel Pizinger, CSc.

předseda komise pro obhajobu disertačních prací studijního programu dermatovenerologie

Dermatovenerologická klinika LF UK a FN Plzeň

Obsah

Souhrn.....	4
Summary.....	5
Seznam použitých zkratk a symbolů.....	6
1 Úvod do problematiky.....	7
1.1 Atopie.....	7
1.2 Atopický ekzém.....	7
1.2.1 Etiopatogeneze atopického ekzému.....	7
1.2.1.1 Genetické faktory.....	7
1.2.1.2 Abnormální funkce imunitního systému.....	8
1.2.1.3 IgE zprostředkovaná přecitlivělost.....	8
1.2.1.4 Pozdní typ přecitlivělosti.....	10
1.2.2 Klinický obraz atopického ekzému.....	10
1.2.2.1 Kojenecká forma atopického ekzému.....	10
1.2.2.2 Dětská forma atopického ekzému.....	10
1.2.2.3 Dospělá forma atopického ekzému.....	10
1.2.2.4 Atopický ekzém s postižením především hlavy a krku.....	11
1.2.2.5 Pruritus.....	11
1.2.3 Histologický obraz atopického ekzému.....	11
1.2.4 Komplikace atopického ekzému.....	11
1.2.5 Diferenciální diagnostika atopického ekzému.....	12
1.2.6 Terapie atopického ekzému.....	12
1.3 Malassezie.....	12
1.3.1 Seborhoická dermatitida a Malassezie.....	14
1.3.2 Pityriasis versicolor a Malassezie.....	14
1.3.3 Pityrospirová folikulitida a Malassezie.....	14
1.4 Kvasinky rodu Malassezia a atopický ekzém.....	14
2 Cíl práce.....	16
3 Popis řešení a výsledky výzkumu.....	17
3.1 Materiál a metodika.....	17

3.1.1 Studijní soubor pacientů.....	17
3.1.2 Hodnocení závažnosti atopického ekzému.....	17
3.1.3 Stanovení hladin sérových IgE protilátek.....	17
3.1.4 Statistická analýza.....	17
3.2 Výsledky.....	18
3.2.1 Skupina všech pacientů ve studii: česká + švýcarská.....	18
3.2.2 Skupina švýcarských pacientů.....	21
3.2.3 Skupina českých pacientů.....	23
3.2.4 Porovnání pacientů: česká versus švýcarská skupina.....	26
4 Diskuse.....	27
5 Závěr.....	29
6 Seznam použité literatury.....	30
7 Přehled publikační činnosti autora.....	34
8 Přednášky na odborných setkáních.....	35

Souhrn

Úvod: Atopický ekzém je časté chronické zánětlivé onemocnění kůže. V jeho klinickém průběhu, ve kterém se střídají období remise a exacerbace projevů, může hrát roli mnoho různých alergenů. Lipofilní kvasinka *Malassezie spp.* je součástí běžné kožní mikrobiální flóry. Předpokládá se, že přecitlivělost k antigenům *Malassezie* ovlivňuje průběh ekzémového onemocnění s postižením především hlavy, krku a horní části trupu (HNAD).

Metodika: Do studie jsme zařadili celkem 240 pacientů s atopickým ekzémem. Studie probíhala na Dermatologické klinice v Curychu a na Dermatovenerologické klinice Fakultní nemocnice a LFUK v Plzni. Na základě klinického obrazu atopického ekzému jsme vytvořili podskupinu pacientů s postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu (HNAD). Tíže atopického ekzému byla hodnocena pomocí EASI skórovacího systému (ve Švýcarsku) a pomocí SCORAD systému (v České republice).

Výsledky: Celkové IgE bylo zvýšené (≥ 100 kU/l) u 72,5% pacientů. Pozitivní specifické IgE proti *Malassezii* ($\geq 0,35$ kU/l) bylo zachyceno u 54,2% pacientů. U mužů byla zjištěna významně častější senzibilizace na antigeny *Malassezie* (p-hodnota = 0,013). Pacienti ze skupiny HNAD a pacienti mladší 25 let měli signifikantně vyšší hodnoty specifických IgE proti *Malassezii* (HNAD: p-hodnota = 0,001; ≤ 25 let: p-hodnota = 0,043). Pacienti s atopickou konstitucí byli častěji senzibilizováni na antigeny *Malassezie* (p-hodnota < 0,001). Ve švýcarské skupině pacientů nebyl zjištěn žádný signifikantně významný vztah mezi EASI a hodnotami specifického IgE proti *Malassezii* nebo hladinami celkového IgE. Oproti tomu, v české skupině pacientů byla prokázána korelace mezi hodnotami celkového IgE a *Malassezie*-specifického IgE a SCORAD.

Závěr: U více než poloviny pacientů zařazených do naší studie byly zjištěny pozitivní *Malassezie*-specifické IgE protilátky. Naše studie v některých aspektech potvrzuje výsledky předchozích citovaných prací, ale zároveň jako první popisuje rozsáhlou populaci ze střední Evropy, se zaměřením na rozdíly mezi pacienty s HNAD a non-HNAD.

Summary

Background: Atopic dermatitis is a common chronic inflammatory skin disease. Numerous IgE-inducing allergens play role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Malassezia*, the predominant skin microbiota fungus, is considered to exacerbate atopic dermatitis, especially in a subset of patients with head and neck type. In the present study the relationship between atopic dermatitis and sensitization to *Malassezia* antigens was investigated.

Methods: We assessed 240 patients with atopic dermatitis seen at the Department of Dermatology, University Hospital in Zürich, Switzerland and at the Department of Dermatovenereology, University Hospital in Pilsen, Czech Republic. The subgroup of patients with primarily head, neck and upper torso pattern of atopic dermatitis was considered as HNAD type. Severity of eczema was assessed with EASI in Switzerland and with SCORAD in the Czech Republic. Total serum IgE and specific IgE to *Malassezia* were determined and correlated with clinical picture of atopic dermatitis, gender, age and severity of eczema.

Results: Total IgE was elevated in 72.5% of patients. Specific IgE to *Malassezia* was positive (≥ 0.35 kU/l) in 54.2% of patients. Men were significantly more often sensitized to *Malassezia* antigen (63.5% of men versus 47.1% of women, p-value 0.013). Concurrently, patients with HNAD and group of patients younger than 25 years had higher levels of specific IgE to *Malassezia* (HNAD, p-value 0.001; ≤ 25 years, p-value 0.043). Patients with atopy were also more frequently sensitized to *Malassezia*. No significant relationship between EASI and the level of total IgE or specific IgE to *Malassezia* was observed. In contrast, correlation between SCORAD and the level of total IgE and specific IgE to *Malassezia* was demonstrated.

Conclusions: In our study more than half of the patients suffering from atopic dermatitis were sensitized to *Malassezia* antigens. Our results confirm the findings of previous studies, but our study is the first to describe a large central European population, including the aspects of HNAD/non-HNAD.

Seznam použitých zkratk a symbolů

WAO – World Allergy Organisation

IgE – imunoglobulin E

AE – atopický ekzém

NMF - Natural Moisturizing Factor

SPINK5 - inhibitor serinové proteázy

LEKTI - Lymphoepitelial Kazal-Type related Inhibitor

KLK7 - kalikrein 7

TLR2 - toll-like receptor 2

NOD1 - cytosolový obranný sensor proti baktériím

IL - interleukin

APC – antigen-prezentující buňky

IDEC – inflamatorní dendritické epidermální buňky

FC ϵ RI – vysokoafinní receptor pro IgE

CLA – usidlovací kožní lymfocytární antigen

RAST - radioalergosorbent test

FEIA - fluorescenční enzymová imunoanalýza

BAT - test aktivace bazofilů

CD – cluster of differentiation

SPT – kožní prick testy

APT - atopické epikutánní testy

HNAD – head-and-neck atopic dermatitis

CLR - lektinové receptory typu C

mRNA – messenger RNA – mediátorová jednovláknová nukleová kyselina

HBD-2 – humánní-beta-defenzin 2

TNF α – tumor-necrosis-factor alfa

CZ – česká skupina pacientů

ŠV – švýcarská skupina pacientů

1 Úvod do problematiky

1.1 Atopie

Atopie byla definována světovou alergologickou organizací (WAO) jako dědičný sklon k rozvoji alergických onemocnění s tvorbou IgE protilátek po expozici různým antigenům. Mezi tato onemocnění patří atopický ekzém, astma a alergická rinokonjunktivitida (33). Prevalence atopie stále roste. Na podkladě genetické predispozice v kombinaci s dalšími faktory, jako je např. průmyslové znečištění, tabákový kouř, smog atd. může po kontaktu s alergenem docházet ke vzniku IgE zprostředkované přecitlivělosti s hyperreaktivitou kůže a sliznic (8). Uvažuje se i o tom, že zvýšená hygiena a méně infekčních (především parazitárních) onemocnění vede k nedostatečné stimulaci a následně horší obranyschopnosti imunitního systému obyvatel průmyslově vyspělých zemí (8). U mnohých pacientů, kteří v dětství trpěli atopickým ekzémem, dojde v dospělosti k rozvoji astmatu nebo alergické rýmy. Toto přesmyknutí mezi různými formami atopie se nazývá „atopický pochod“ (5, 7, 36).

1.2 Atopický ekzém

Pro toto onemocnění existovala v minulosti celá řada synonym: endogenní ekzém, neurodermatitis, neurodermitis, Besnierovo prurigo. V české literatuře je nyní nejčastěji používán pojem atopický ekzém, naopak v anglosaské literatuře je běžnější název atopická dermatitida.

Atopický ekzém (AE) je chronické neinfekční zánětlivé kožní onemocnění charakterizované svěděním a suchostí kůže. Začíná obvykle již v dětství a má dlouhodobý průběh s opakovanými novými vzplanutími. Často se může vyskytovat společně s astmatem nebo alergickou rýmou. Atopický ekzém patří mezi nejčastější kožní choroby s výskytem u téměř 20% dětí školního věku (8, 62). Prevalence u dospělých se pohybuje mezi 1 až 3% (8, 62). Většina pacientů má největší problémy v prvních letech života, s přibývajícím věkem je patrný sklon ke zlepšování projevů onemocnění a k postižení jen určitých oblastí těla.

1.2.1 Etiopatogeneze atopického ekzému

Etiologie a patogeneze atopického ekzému není stále plně prozkoumána. Jde o komplexní proces, ve kterém velkou roli hrají genetická predispozice k atopii (astma, alergická rinokonjunktivitida, potravinová nebo inhalační alergie), porušená bariérová funkce kůže a abnormální činnost imunitního systému (62).

Na porušené funkci epidermální bariéry se podílí celá řada změn: zvýšená transepidermální ztráta vody, zvýšená permeabilita, redukované množství epidermálních lipidů, abnormální syntéza ceramidů, nedostatečná produkce mazu (sebastáza), snížená alkalirezistence atd. (8). Porušená bariérová funkce kůže usnadňuje nejen pronikání alergenů z vnějšího prostředí, ale také nedostatečně chrání před působením různých iritancí (např. mycích a čisticích prostředků, vlny).

1.2.1.1 Genetické faktory

Přibližně dvě třetiny nemocných mají pozitivní rodinnou anamnézu. Jde o dědičnost polygenního typu. Metodami molekulární genetiky se v roce 2006 podařilo u pacientů s AE ozřejmit důležitou mutaci v genu kódujícím filaggrin v chromozomální oblasti 1q21 (30). Filaggrin je protein, který se podílí na formování epidermální bariéry vazbou keratinu v cytoskeletu keratinocytů (8). Štěpné produkty filaggrinu, vznikající při defosforylaci a štěpení polyproteinu profilaggrinu serinovými proteázami, se účastní tvorby přirozeného zvlhčujícího faktoru (Natural Moisturizing Factor, NMF), tím přispívají k hydrataci korneocytů (30). Geneticky podmíněný nedostatek filaggrinu vede k suchosti stratum corneum a podílí se na zvýšené transepidermální ztrátě vody. Tato mutace byla prokázána i u onemocnění ichthyosis vulgaris. S narušením funkce kožní bariéry je spojený i polymorfismus genu SPINK5, kódujícího inhibitor serinové proteázy LEKTI (Lymphoepithelial Kazal-Type related Inhibitor). Tento inhibitor je klíčový v regulaci

kalikreinu 7 (KLK7) a jeho mutace vede k porušení soudržnosti stratum corneum (70). Byla také prokázána souvislost mezi polymorfismem genu pro Toll-like receptor 2 (TLR2) (1) a genu kódujícího cytosolový obranný sensor proti bakteriím (NOD1) s těžkými formami AE a recidivujícími bakteriálními superinfekcemi (72).

1.2.1.2 Abnormální funkce imunitního systému

V patogenezi AE se uplatňují různé složky imunitního systému. Bylo prokázáno, že u pacientů s AE jsou secernovány v menším množství antimikrobiální peptidy (především β -defenziny a katelicidiny), které představují důležitou součást nespecifické imunitní odpovědi. Specifická imunitní reakce je u pacientů s AE charakterizována nerovnováhou mezi Th2 a Th1 lymfocyty. Akutní zánětlivá odpověď je u AE spojena s vyšším počtem Th2 lymfocytů v periferní krvi. Th2 buňky produkují IL-4, IL-5 a IL-13, tyto cytokiny dále stimulují diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky schopné produkovat IgE protilátky. Poškození kůže alergeny z vnějšího prostředí, mikrobiálními vlivy nebo škrábáním vede k uvolnění prozánětlivých cytokinů a chemokinů z keratinocytů. Dochází k indukci exprese adhezních molekul na endoteliích cév, je usnadněna extravazace zánětlivých buněk do tkáně.

V kůži pacientů s AE se vyskytuje větší množství antigen prezentujících buněk (APC). Jsou to především buňky Langerhansovy a inflamatorní dendritické epidermální buňky (IDEC), které na svém povrchu exprimují vysokoafinní receptory pro IgE (FC ϵ RI). Antigen prezentující buňky s největší pravděpodobností vycytávají alergeny z vnějšího prostředí právě prostřednictvím FC ϵ RI. Langerhansovy buňky s navázaným alergenem migrují z epidermis do regionálních lymfatických uzlin, kde dochází k indukci diferenciaci T lymfocytů do Th2 subtypu (6). Aktivované Th2 lymfocyty exprimují na svém povrchu usidlovací kožní lymfocytární antigen (CLA), který jim umožňuje migraci zpět do dermis. Dochází k produkci různých cytokinů (např. TNF α), indukujících apoptózu keratinocytů. Intercelulární E-kadherin je uvolněn, ale desmozomy zůstávají intaktní. To vede ke vzniku intercelulárního edému (spongióza).

V chronické fázi AE začíná převažovat spíše Th1 odpověď, zvyšuje se produkce Th1 cytokinů (např. IFN- γ , IL-12). Na udržení chronické fáze se podílí především cytokiny IL-12, IL-18 a cytokiny působící remodelaci tkáně (IL-11, IL-17) (6).

1.2.1.3 IgE zprostředkovaná přecitlivělost (I. typ alergické reakce)

U AE se rozlišují dvě formy: alergická tzv. extrinzitní forma, která je spojená s IgE senzibilizací a postihuje 70 až 80% pacientů (65). Druhá forma se nazývá intrinzitní tzv. nealergická a vzniká bez IgE zprostředkované senzibilizace.

U pacientů s intrinzitní formou AE nenacházíme žádnou IgE zprostředkovanou senzibilizaci. Nealergická, intrinzitní forma AE je přirovnávána k intrinzitní formě astmatu. Přesná prevalence intrinzitní formy AE je ale kontroverzní, jelikož je možné argumentovat tím, že nikdy nejsou u konkrétního pacienta testovány všechny potencionální alergeny (24). Obecně jsou u intrinzitní formy AE nižší hodnoty celkového IgE.

Při zhoršování extrinzitní (alergické) formy AE může hrát roli mnoho různých alergenů. U této skupiny pacientů s AE se v průběhu života vytvářejí specifické IgE protilátky proti alergenům z vnějšího prostředí (76). Ve střední Evropě je u pacientů s AE nejčastěji prokazována přecitlivělost na roztoče, kočičí srst, pyly trav. U dětí v batolecím věku je častá alergie na bílkovinu vaječného bílku a kravského mléka, v závislosti na zavádění dalších potravin do jídelníčku se dále objevují alergie na ořechy, arašidy, pšeničnou mouku, ovoce, zeleninu nebo sóju. Časná senzibilizace na potravinové alergeny se vytváří u dětí s AE již v průběhu prvních let života. Senzibilizace na inhalační alergeny se objevuje zpravidla později (5, 7, 36).

Vzniku IgE zprostředkované přecitlivělosti předchází proces senzibilizace. Alergen se po proniknutí do organismu dostává do kontaktu s antigen prezentujícími buňkami (APC). APC antigen zpracují a dále ho prezentují naivním pomocným T lymfocytům (Th0). Th0 lymfocyty se diferencují v Th2 fenotyp, který produkuje celou řadu cytokinů jako např. IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 nebo IL-13. Tyto cytokiny indukují tvorbu IgE protilátek B lymfocyty. Vytvořené IgE jsou uvolněny do oběhu, ale jejich podstatná část se svými Fc fragmenty váže na vysokoafinní receptor FCεRI na povrchu mastocytů (žírné buňky) a bazofilů. Tímto je proces senzibilizace ukončen. Poté pokud se alergen naváže na volné Fab fragmenty IgE a přemostí dvě sousední molekuly IgE na povrchu mastocytů nebo bazofilů, dojde ke kaskádě reakcí s intracelulárním influxem vápníku.

Tato aktivace mastocytů a bazofilů vede k jejich degranulaci. Do okolí buněk je v sekrečních granulích uvolněno velké množství různých mediátorů. Nejdůležitějším je histamin, jeho biologické účinky zahrnují bronchokonstrikci, sekreci hlenu, vazodilataci, stimulaci nervových zakončení a zvýšení permeability cévní stěny s otokem tkáně. Dalšími mediátory jsou například serinové proteázy (tryptáza, chymáza) nebo proteoglykany (heparin, chondroitin sulfát). Vznikají i metabolity kyseliny arachidonové, jako jsou prostaglandiny a leukotrieny se silnými bronchokonstrikčními a vazodilatačními účinky. Také stimulují sekreci hlenu, zvyšují cévní permeabilitu a mohou působit chemotakticky na neutrofile a eozinofily.

IgE zprostředkovaná senzibilizace může být prokázána pomocí kožních testů (prick nebo intradermální testy) nebo stanovením hladiny specifických IgE protilátek v séru. Běžně se používají prick testy, při kterých se pomocí speciální lancety zavede do epidermis malé množství dobře charakterizovaného alergenového extraktu. Po 15 minutách se provádí odečet; za pozitivní reakci je považován vznik kopřivkového pomfu s erytémem o velikosti ≥ 3 mm. K snížení rizika získání falešně negativních výsledků je před testováním nutné vysadit všechny léky blokující alergickou reakci – antihistaminika (nepodávat ≥ 10 dní před testováním), celkové kortikosteroidy nebo lokální kortikosteroidy aplikované v místě testu (vysadit ≥ 3 týdny před vyšetřením), tricyklická antidepresiva (≥ 2 týdny před vyšetřením). Kontraindikací prick testů jsou akutní horečnaté onemocnění, akutní exacerbace alergického onemocnění, dermatóza v místě testování (nejčastěji volární strana předloktí) nebo těhotenství.

K určení sérové hladiny specifických IgE protilátek se v dnešní době používají různé modifikace původní metody z 60. let minulého století tzv. RAST (radioalergosorbent test = sendvičová radioimunoesej). Při této metodě je vyšetřovaný alergen navázan na pevnou fázi (papírový disk). Tento disk je inkubován se sérem pacienta, dochází k vazbě specifického IgE ze séra na disk. Po promytí disku je provedena druhá inkubace s protilátkou proti IgE, která je značená radioaktivním izotopem jódu. Intenzita navázané radioaktivity je pak přímo úměrná množství specifického IgE ve vyšetřovaném vzorku.

V dnešní době je práce s radioaktivními látkami eliminována a anti-IgE protilátky jsou značeny nejčastěji enzymaticky (ELISA, chemiluminiscence, fluorescence). V průběhu naší studie jsme ke stanovení specifických IgE protilátek použili metodu ImmunoCAP® Thermofisher Scientific, která je v dnešní době považována za jednu z nejlepších díky své vysoké citlivosti a specifitě. ImmunoCAP® pracuje na principu fluorescenční enzymové imunoanalýzy (FEIA). Tato metoda je modifikací původní sendvičové radioimunoeseje. Anti-IgE protilátka je během tohoto testu značena enzymem, který reaguje se substrátem a dochází ke vzniku produktu detekovatelného fluorometricky.

Důležité je i správné posouzení získaných výsledků. Pozitivní výsledek odráží pouze vyšší pravděpodobnost alergické reakce. Zjednodušeně lze říci, že čím vyšší je hladina specifického IgE, tím je větší pohotovost imunitního systému ke vzniku alergické reakce. Hodnoty specifických IgE je nutné porovnávat i s hladinou celkového IgE. Při velmi vysokých hodnotách celkového IgE je vyšší riziko falešně pozitivních výsledků. Na závěr je nutné zdůraznit, že nadprodukce specifických IgE protilátek je u pacientů s extrinzitní formou AE velmi častá, nicméně klinická relevance

zjištěné IgE senzibilizace v průběhu AE zůstává kontroverzní. Výsledky získané v alergologických testech je nutné dávat do souvislosti s anamnestickými údaji a s výsledky dalších vyšetření (kožní testy, provokační testy atd.).

Novějším vyšetřením časné přecitlivělosti, doplňujícím stanovení specifických IgE protilátek, je funkční test aktivace bazofilů (BAT). Během vyšetření BAT je pomocí průtokové cytometrie stanovena exprese CD63 a CD203c na povrchu bazofilů po jejich aktivaci alergenem.

1.2.1.4 Pozdní přecitlivělost (zprostředkovaná T lymfocyty, IV. typ alergické reakce)

V patogenezi atopického ekzému je důležitá nejen IgE zprostředkovaná alergická reakce (I. typ, časná přecitlivělost), ale i reakce zprostředkovaná antigen-specifickými T lymfocyty (IV. typ, pozdní přecitlivělost). Alergen je zpracován antigen-prezentujícími buňkami, které ho poté prezentují na svém povrchu ve spojení s MHC glykoproteiny II. třídy již dříve senzibilizovaným Th1 lymfocytům. Příchod senzibilizovaných T lymfocytů do dermis trvá 24-48 hodin a vede k další atrakci makrofágů, neutrofilů, eozinofilů a dalších buněk a následné produkci prozánětlivých mediátorů. Vzniká klinicky patrná zánětlivá reakce s edémem a indurací tkáně.

K ozřejmení alergické reakce IV. typu jsou nevhodnější epikutánní testy. Atopické epikutánní testy (APT) zatím nepatří mezi běžně užívané vyšetřovací metody. Jejich použití není stále plně standardizováno. Provedení i hodnocení je obdobné jako u klasických epikutánních testů. Nejčastěji na kůži zad aplikujeme inhalační nebo potravinové alergeny, které jsou ponechány neprodyšně překryty 48 hodin. Pro použití v APT jsou dostupné komerčně připravované inhalační alergeny rozpuštěné ve vazelině. Potravinové alergeny je doporučeno připravovat z čerstvých potravin a sypké látky (např. mouka) ředit destilovanou vodou. Výsledek testu hodnotíme za 48-72 hodin, intenzita reakce je popisovaná křížky: erytém, ojedinělé papulky +; erytém, edém, papulky až splývající infiltrace ++; papulovezikuly, vezikuly +++; bula, madidace, poleptání (toxická reakce) ++++. Atopické epikutánní testy jsou specifitější než prick testy a hladiny specifických IgE, ale jsou méně senzitivní (15).

1.2.2 Klinický obraz atopického ekzému

Atopický ekzém může mít různý klinický vzhled projevů a může se vyskytovat v různých lokalizacích v závislosti na věku pacienta. Tyto formy atopického ekzému v sebe buď plynule přecházejí, nebo některá z forem zcela chybí. Společným znakem všech forem AE je pruritus.

1.2.2.1 Kojenecká forma atopického ekzému

První projevy ekzému vznikají většinou mezi 2. a 6. měsícem života v oblasti tváří. V tomto období projevy mokvají a dochází k tvorbě šupin. Postupně se mohou šířit po celé hlavičce a dále přecházet i na trup a končetiny. Postiženy jsou většinou extensorové plochy končetin, častou lokalizací je i oblast pod plenami. Projevy úporně svědí, proto jsou děti neklidné a špatně spí. V tomto období mohou při zhoršování ekzému hrát roli různé potravinové alergeny, v závislosti na postupném přidávání nových potravin do jídelníčku (nejčastěji kravské mléko a vejce). Zhoršení může vyvolat i prořezávání zubů, zapocení, infekční nemoci, očkování atd..

1.2.2.2 Dětská forma atopického ekzému

V tomto období se projevy ekzému tvoří v loketních a podkolenních jamkách, na zápěstí, hřbetech rukou a na krku. Ekzémové projevy se často objevují i na bradavkách nebo očních víčkách, bývá přítomna cheilitida. Kůže je spíše hrubá, drsná, lichenifikovaná s exkoriacemi po škrábání. Projevy bývají lokalizovány symetricky. Během prvních školních let se zhojí přibližně 75% nemocných dětí (62).

1.2.2.3 Dospělá forma atopického ekzému

Někdy se tato forma atopického ekzému objeví jako první, ale většinou jí předchází forma kojenecká a dětská nebo jiné projevy atopie (astma, alergická rinitida). Lokalizace i klinický vzhled projevů u dospělé formy je stejný jako u formy dětské. Převládá suchost kůže a výrazné svědění. Lichenifikované projevy nacházíme především ve flexurách, hřbetech rukou nebo na prsních bradavkách. Kůže v obličeji bývá bledá. Často dochází ke vzniku pozánětlivých hyperpigmentací. U mírných forem AE se mohou vyskytovat jen dyshidrotické puchýřky na prstech rukou, dlaních a ploskách. V tomto období může při zhoršování AE hrát roli psychický stres. Popisuje se tendence ke zhojení v období mezi 40. a 50. rokem života.

1.2.2.4 Atopický ekzém s postižením především hlavy, krku a horní části trupu (Head-and-Neck Atopic Dermatitis, HNAD)

Je považován za samostatnou jednotku. Uvažuje se o tom, že kolonizace kůže *Malassezií* hraje podstatnou roli při zhoršování tohoto typu AE (76). Pacienti s postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu mívají častěji pozitivní kožní prick testy (Skin Prick Tests, SPT) a pozitivní hodnoty specifických IgE proti antigenům *Malassezie* ve srovnání se zdravou populací nebo při srovnání s pacienty s ekzémovými projevy v jiných lokalizacích (14).

1.2.2.5 Pruritus

Jedním z hlavních symptomů AE je pruritus. U pacientů s AE je snížený práh pro svědění, i mírné podráždění kůže může vyvolat pocit svědění. Vzhledem k tomu, že terapie antihistaminiky bývá nedostatečná, je zřejmé, že se nejedná o stav vyvolaný pouze uvolněním histaminu. Bylo zjištěno, že především cytokin IL-31, jehož hladina je v kůži pacientů s AE zvýšena, je zodpovědný za intenzivní pruritus (8). Škrabání kůže vyvolané pruritem vede ke vzniku exkoriací a dalšímu poškozování kožní bariéry.

1.2.3 Histologický obraz atopického ekzému

Akutní projevy AE mají histologický nálezn velmi podobný kontaktnímu ekzému. Je patrná spongióza s intraepidermálními puchýřky. Je přítomen i perivaskulární lymfocytární infiltrát. V chronickém stadiu dominuje nepravidelná akantóza s hyper- a parakeratózou.

1.2.4 Komplikace atopického ekzému

Pacienti s AE jsou velmi náchylní k virovým nebo bakteriálním kožním infekcím. Na jejich vzniku se kromě porušené bariérové funkce kůže a snížené produkce antimikrobiálních peptidů, může podílet i terapie imunosupresivy (např. kortikosteroidy). U pacientů s AE je častá kolonizace povrchu kůže grampozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*. Může dojít ke vzniku impetiginizovaných ložisek s případnou reaktivní bolestivou lymfadenopatií. Porušená epidermální bariéra také usnadňuje penetraci stafylokokových exotoxinů (SEA, stafylokokový enterotoxin A; SEB, stafylokokový enterotoxin B; TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1), které slouží jako tzv. superantigeny stimulující větší množství T lymfocytů a tím přispívají k přetrvávání zánětlivé reakce v kůži.

Další nebezpečnou komplikací AE je infekce Herpes simplex virem. Vzniká tzv. eczema herpeticum, závažné onemocnění s celkovými příznaky. V klinickém obraze eczema herpeticum dominují puchýře s centrální vkleslinou vznikající na erodovaných ekzematózních plochách. Toto onemocnění vyžaduje celkovou antivirovou terapii. Další virovou komplikací u pacientů s AE může být diseminace molusek. *Molluscum contagiosum* je vyvoláno poxvirem, jde o tuhé žlutavé papuly s centrální vkleslinou. Odstraňují se abrazií ostrou lžičkou nebo pomocí kryoterapie. Důležité jsou i iatrogeně vzniklé komplikace. Dlouhodobá terapie lokálními kortikosteroidy může mimo jiné způsobit vznik strií, steroidního akné, periorální dermatitidy a atrofie kůže.

Pacienti s AE jsou ohroženi častějším vznikem kontaktního alergického ekzému. Uvádí se, že 41 - 64% pacientů s AE trpí kontaktní alergií (45). Velký význam v prevenci má správné pracovní zařazení atopiků, nejsou vhodná povolání jako holičství, pekařství, ošetřování zvířat atd. (62). Je zajímavé, že pozměněná imunitní odpověď kůže se u pacientů s AE projevuje méně častým vznikem kontaktní alergické dermatitidy například po expozici dinitrochlorobenzenu (8). Dinitrochlorobenzen je nejsilnější kontaktní alergen, kterým lze senzibilizovat většinu zdravých lidí. Ale například kontaktní alergická reakce na nikl je u pacientů s AE daleko častější.

1.2.5 Diferenciální diagnostika atopického ekzému

V diferenciální diagnostice kojenecké formy AE nejčastěji zvažujeme seborhoickou dermatitidu, která se ale objevuje spíše v plenkové oblasti a méně mokvá. Dále musíme odlišit scabies, plenkovou dermatitidu nebo akutní psoriázu. U dětí je nutné myslet i na vzácnější onemocnění jako je histiocytóza z Langerhansových buněk. Existuje také celá řada syndromů, u kterých se vyskytují kožní změny charakteru AE: Nethertonův syndrom, Wiskott-Aldrichův syndrom, HyperIgE syndrom nebo Omennův syndrom. U dětí i dospělých odlišujeme především scabies, pyodermie a alergickou kontaktní dermatitidu. Lichenifikované projevy mohou být zaměněny za lichen simplex chronicus nebo nummulární ekzém. U dospělých atopiků se na ruku vyskytuje často pouze iritační dermatitida tzv. ekzém z opotřebenosti.

1.2.6 Terapie atopického ekzému

Prostředky léčby se volí podle stadia ekzému. Při akutním výsevu ekzému se na mokvající plochy nejlépe hodí obklady, lotiony nebo krémy. U chronických forem ekzému se osvědčuje použití mastíových forem, někdy pod okluzivním obvazem. Nejčastěji se využívají lokální kortikosteroidy, někdy v kombinaci s dehty nebo antimikrobiálními přísadami. Relativní novinkou v terapii AE jsou externa obsahující inhibitory kalcineurinu – pimekrolimus a takrolimus. Z celkově podávaných léků se užívají antihistaminika (pomáhají tlumit alergický zánět v kůži, potlačují svědění), případně antibiotika (ke zvládnutí druhotné bakteriální infekce). Dalšími metodami jsou fototerapie a léčebné olejové koupele. Při závažném postižení nereagujícím na předchozí léčbu je možné použít krátkodobě celkové kortikosteroidy nebo imunosupresivum cyklosporin A. Významným faktorem v léčbě je také pravidelné a důsledné ošetřování kůže vhodnými promašťujícími přípravky a používání šetrných mycích prostředků. Efektivní terapie AE, které se podaří zlepšit funkci poškozené kožní bariéry, je zásadní k zamezení vstupu alergenů z vnějšího prostředí do organismu. Terapie může být zdlouhavá a nemůže být zcela úspěšná bez eliminace zhoršujících faktorů. Některé práce naznačují, že pacienti s AE, především s HNAD formou, mohou profitovat také z lokální (14, 51, 74) nebo celkové antimykotické terapie (ketokonazol nebo itrakonazol) (3, 61).

1.3 Malassezie

Různé mikroorganismy mohou být důležité v patogenezi AE. Patří mezi ně především *Staphylococcus aureus* a oportunní kvasinka *Malassezie*. *Malassezie spp.* jsou součástí běžné kožní mikrobiální flóry i u zdravých osob nebo zvířat, na rozdíl od *Staphylococcus aureus*, který zdravou kůži většinou nekolonizuje.

E. Eichstedt popsal jako první v roce 1846 mykotické elementy v ložiscích pityriasis versicolor (20). Tento mikroorganismus byl pojmenován jako *Microsporon furfur* v roce 1853 Charlesem Robinem. Název *Malassezia furfur* byl poprvé použit Francouzem Henri Bailon v roce 1889 (9). Zdrojem nesrovnalostí v taxonomii byl dlouho dimorfismus této houby. Myceliová fáze byla nazývána *Malassezie* a fáze kvasinky (spóry) byla považována za odlišný mikroorganismus, který byl R. Sabouraudem v roce 1904 pojmenován jako *Pityrosporum* (9). Až o mnoho desetiletí později, v roce 1977 byl potvrzen dimorfní charakter této houby. Na základě nových poznatků se od roku 1986 rod souhrnně označuje jako *Malassezie*. *Pityrosporum orbiculare* a *ovale* splynulo s druhem *Malassezia furfur* a zoofilní *Pityrosporum pachydermatis* byl přejmenován na *Malassezia*

pachydermatis (9). Rodové jméno bylo zvoleno na počest francouzského anatoma a histologa Louisa-Charlese Malasseze (1842–1909) (9). V posledních dvou desetiletích byly za pomoci molekulární biologie identifikovány další druhy *Malassezie*. Především díky japonským autorům, je v současné době známo větší množství lidských druhů *Malassezií* (*M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. dermatitis*, *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. yamatoensis*, *M. slooffiae*, *M. japonica*), které byly identifikovány pomocí PCR metody, nezávislé na kultivačním vyšetření (63, 76). Ze zvířecí kůže bylo izolováno 5 druhů (*M. nana*, *M. equina*, *M. caprae*, *M. pachydermatitis*, *M. cuniculi*) (9, 31). Všechny druhy *Malassezie* s výjimkou *M. pachydermatitis* jsou striktně lipofilní (48). Moderními metodami je možné z ohraničené oblasti na kůži u konkrétního člověka identifikovat průměrně 2–3 různé druhy *Malassezií* (59).

Lipofilní kvasinky rodu *Malassezie* se objevují na kůži brzy po narození (41). Podle výsledků tureckých autorů bylo již v prvním měsíci života lipofilními kvasinkami (nejčastěji *Malassezia furfur*) kolonizováno 37% kojenců (2). Naproti tomu, výsledky kanadské studie označili *Malassezia globosa* jako nejčastější druh kolonizující kůži dětí do 3 let věku (29). Výsledky získané při vyšetřování zdravých dospělých jsou podobně rozdílné. Za nejčastější druhy vyskytující se na lidské zdravé kůži jsou považovány *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis* (29, 31, 63). Naopak, *Malassezia furfur* je na zdravé kůži vzácná. Bez ohledu na konkrétní druhy je kolonizace kůže *Malassezia spp.* velmi častá (u 80 – 100% zdravých dospělých) (29).

Z morfologického hlediska je tato kvasinka charakterizována velmi hrubou buněčnou stěnou, která obsahuje mimořádně velké množství lipidů, desetkrát více než například *Candida albicans* (9). Vnější povrch buněčné stěny je obalený lamelární kapsulou, tvořenou tuky, která pravděpodobně umožňuje adhezi kvasinek ke keratinocytům. Zároveň má schopnost blokovat zánětlivou reakci hostitele, inhibicí tvorby cytokinů keratinocyty (9).

Schopnost přežití těchto lipofilních kvasinek je omezena závislostí na externích zdrojích tuků. *Malassezie* osidlují oblasti bohaté na mazové žlázy, jako je kštice, obličej, krk, horní polovina trupu (především nad sternem a mezi lopatkami). Ke svému růstu potřebují lipidy obsažené v kožním mazu. Proto se kvasinky rodu *Malassezia* přizpůsobily životu v povrchových rohových vrstvách epidermis, které jsou pokryté tenkým filmem emulze potu a kožního mazu (9). Produkce mazu (tzv. seborea) je vysoká v prvních 3 měsících života, poté v průběhu dětství klesá a znovu se zvýrazňuje v pubertě a přetrvává přibližně do padesáti let věku (13). Je zřejmé, že i věk pacientů může hrát důležitou roli při kolonizaci kůže *Malassezia spp.*

Malassezie vyžaduje médium s obsahem lipidů také při *in vitro* kultivaci. Jednotlivé druhy *Malassezie* se liší schopností růstu na různých mediích obohacených o lipidy při teplotě 37°C. Na běžně používaném Sabouraudově agaru *Malassezie* neroste. Právě nerozpoznání lipofilního charakteru této kvasinky bylo v minulosti dlouho příčinou neúspěchů při její kultivaci. Především dlouhodobá kultivace některých druhů *Malassezie* je stále velmi náročná a zatím se nepodařilo připravit universální kultivační médium, které by dokázalo spolehlivě zachytit a udržet všechny druhy kvasinek *Malassezie* (9). Prvním krokem v laboratorní diagnostice by mělo být mikroskopické vyšetření. Nejjednodušší variantou je louhový preparát. Při tomto rychlém a poměrně nenáročném vyšetření se na podložní sklíčko k odebraným kožním šupinám kápne 20% hydroxid draselný (68). Preparát se ponechá asi hodinu macerovat, je nutné zamezit vysychání. Ve vlhké komůrce je možné preparát skladovat i déle. K usnadnění prohlížení lze louhový preparát dobarvit Parkerovým inkoustem. Spolehlivost tohoto vyšetření je poměrně vysoká. Pozitivní nález mycelia v nativním louhovém preparátu má ale v mykologickém vyšetření pouze orientační charakter. Výjimku tvoří právě *Malassezie* s typickým vzhledem nazvaným „spaghetti a masové kuličky“ (8). V mikroskopu nacházíme typické do hroznů uspořádané shluky pučících spor a krátké segmentované hyfy. Tento obraz je pro zkušeného mykologa dostatečný k potvrzení diagnózy.

Kvasinky rodu *Malassezia* produkují různé metabolity, které se uplatňují při interakci s hostitelským organismem. Při kultivaci za přítomnosti kyseliny olejové syntetizují

dikarboxylovou kyselinu azelaovou, která působí jako kompetitivní inhibitor enzymu tyrozinázy (9). Blokáda tohoto klíčového enzymu melanogeneze může mít za následek sníženou produkci melaninu v melanocytech hostitele vedoucí k tvorbě hypopigmentovaných ložisek na kůži (9). Všechny druhy *Malassezie* mají *in vitro*, za přítomnosti L-DOPA v kultivačním médiu, schopnost produkovat černý, melaninu podobný pigment. Melanizované kvasinky byly prokázány i *in vivo* v ložiscích seborhoické dermatitidy (9). Melaninové pigmenty patří mezi významné faktory virulence, zvyšují odolnost mnohých patogenních hub vůči antimykotikům, snižují vnímavost na toxické reaktivní metabolity kyslíku, vznikající v průběhu zánětlivé reakce a chrání houby před působením UV záření (9).

Malassezia spp. jsou mimo atopický ekzém asociovány i s jinými kožními chorobami, jako jsou pityriasis versicolor, pityrospirová folikulitida nebo seborhoická dermatitida (25, 48). Uvažuje se o tom, že *Malassezie* hrají určitou sekundární roli i u psoriázy, především v oblasti kštice (22, 25, 48, 50).

1.3.1 Seboroická dermatitida a *Malassezie*

Seboroická dermatitida je častá chronická dermatóza, vyskytující se ve dvou formách: u novorozenců a v dospělosti, častěji u mužů. Projevy jsou lokalizovány do oblastí bohatých na mazové žlázy (tzv. seboroická lokalizace – obličej, kštice, horní část trupu). Seboroická dermatitida reaguje i na klimatické podmínky (zlepšení v létě, u moře, v horském prostředí), zhoršení je připisováno mimo jiné i psychickému stresu. V dospělosti nacházíme růžová ložiska s jemným olupováním a žlutavými mastnými šupinami především ve kštici, v obočí, v nazolabiálních rýhách, nad sternem a mezi lopatkami. U dětí se projevy tvoří ve kštici a v intertriginózních oblastech, mohou se rozšířit po celém těle až do obrazu erythrodermie. Roli hraje především zvýšená tvorba mazu (seborea) a uvažuje se i o mikrobiálních faktorech (především *Malassezia spp.*) (62). Je nepravděpodobné, že mezi počtem nebo konkrétním druhem *Malassezie* a vznikem seboroické dermatitidy existuje jednoduchá příčinná souvislost. Z klinických projevů seboroické dermatitidy lze izolovat stejné druhy *Malassezie* jako ze zdravé kůže, ale tyto kvasinky jsou zde zastoupeny v signifikantně vyšším množství (29). Teorie o účasti *Malassezie* v etiopatogenezi seboroické dermatitidy je podpořena mimo jiné dobrým terapeutickým efektem antimykotik a zlepšením klinických projevů při redukci množství *Malassezie*. Ukázalo se, že seboroická dermatitida není vyvolaná pouze přemnožením *Malassezií*, ale i abnormální imunologickou odpovědí hostitele na jejich přítomnost (9).

1.3.2 Pityriasis versicolor a *Malassezie*

Pityriasis versicolor (tinea versicolor) je onemocnění vyvolané *Malassezií*. Nejčastěji byl z ložisek pityriasis versicolor vykultivován druh *M. globosa*, až na druhém místě byla *M. furfur* (28, 64, 66). Přesný důvod, proč tato komenzální lipofilní kvasinka způsobuje klinicky zřejmé onemocnění jen u některých pacientů, není stále znám. Tato dermatóza se vyskytuje především u mladých pacientů v teplém a vlhkém klimatu (64). Vznik onemocnění podporuje také obezita, hyperhidróza, nedostatečná hygiena, těsné oblečení a kortikosteroidní terapie (64, 68). Důležitý je i imunitní stav jedince, tato choroba je častěji popisována u HIV/AIDS pacientů nebo transplantovaných (8). V klinickém obrazu pityriasis versicolor nacházíme vícečetné, splývající, hnědavé, ostře ohraničené makuly s jemným pityriaziiformním olupováním především na hrudníku a proximálních partiích končetin. *Malassezie* produkují azelaovou kyselinu, která je schopná blokovat syntézu melaninu, proto dochází ke vzniku hypopigmentovaných ložisek, která se zvyrazňují po opálení kůže v okolí přeléčených projevů. Termín „versicolor“ vystihuje přítomnost jak hypopigmentovaných ložisek na opálené kůži tak hnědavých, hyperpigmentovaných makul. Projevy žlutavě fluoreskují při vyšetření ve Woodově světle (62). Dobrý terapeutický účinek mají lokální antimykotika (např. ketokonazol) nebo šampony s obsahem selen-disulfidu a pyrithion zinku (62). Výjimečně ve zvlášť urputných případech nereagujících na lokální léčbu je nutné použít celková azolová antimykotika (např. itrakonazol 200 mg denně po dobu týdne nebo 100 mg po dobu dvou týdnů) (8). Recidivy jsou časté.

1.3.3 Pityrosporumová folikulitida a *Malassezie*

Malassezia furfur způsobuje i vzácné chronické onemocnění vlasových folikulů, které nazýváme Pityrosporum folliculitis (62). Vyskytuje se hlavně u imunosuprimovaných a imunodeficitních osob, především HIV/AIDS pacientů. Klinickému obrazu dominují svědivé folikulárně vázané akneiformní papulopustuly, lokalizované na horní polovině trupu a krku. Terapie je obdobná jako u pityriasis versicolor (8).

U imunosuprimovaných pacientů může kolonizace kůže *Malassezií* vzácně způsobit život ohrožující septický stav, především při kontaminaci parenterálně podávaných intralipidových infúzí určených k realimentaci (8).

1.4 Kvasinky rodu *Malassezia* a atopický ekzém

Porušená epidermální bariéra je pro vývoj AE zásadní a intenzivní svědění u pacientů s touto chorobou vede ke škrábání s dalším porušováním kožního povrchu. Různé látky z vnějšího prostředí a mezi nimi i antigeny kožní mikrobiální flóry mohou snadno pronikat skrz atopickou kůži a přicházet do kontaktu s imunitním systémem hostitele.

Udává se, že kůže pacientů s AE je kolonizována přibližně 50 různými druhy houbových organismů (11). Komenzální mikroorganismy *Malassezia spp.* mezi nimi dominují. Antigenní složení *Malassezií* je velmi komplexní a dynamické, mění se v průběhu růstového cyklu kvasinky. Různé kmeny exprimují jiné sady antigenů a odlišné postupy extrakce vedou k získání rozdílných antigenů (10). U *Malassezií* bylo dosud pomocí imunoblotu popsáno více jak 80 různých antigenů s odlišnou relativní molekulovou hmotností. Nejlépe charakterizované jsou antigeny (alergeny) vázající protilátky třídy IgE (9). Podle oficiální databáze definovaných alergenů (International Union of Immunological Societies, IUIS, <http://www.allergen.org>) bylo popsáno 10 alergenů *Malassezia sympodialis* (označených jako Mala s 1, Mala s 5-13) a 3 alergeny *Malassezia furfur* (Mala f 2-4). Některé alergeny jsou druhově specifické, některé jsou společné pro všechny druhy *Malassezie* (75).

Za fyziologických podmínek přichází *Malassezie* na povrchu kůže do přímého kontaktu především s keratinocyty. Tyto epidermální buňky, jejichž hlavní úlohou je tvorba a udržování epidermální bariéry, se účastní také imunologické odpovědi kůže. Na jejich membránách jsou exprimovány receptory, které jsou schopné rozpoznat cizorodé mikroorganismy. Z hlediska protikvasinkové imunity jsou důležité především dvě rodiny receptorů. Jedná se jednak o toll-like receptory (TLR) a jednak o lektinové receptory typu C (CLR). Současně s indukcí exprese receptorů přirozené imunity se v keratinocytech zvýší i exprese mRNA pro antimikrobiální peptid lidského β -defenzinu-2 (HBD-2) a IL-8. Odpověď keratinocytů na přítomnost *Malassezií* přispívá k obranné reakci hostitele, která je zprostředkována toll-like receptory a následně aktivovanými mechanismy přirozené imunity – dochází k akumulaci neutrofilních granulocytů chemotaktickým působením IL-8. HBD-2 má přímý fungicidní účinek na lipofilní kvasinky (10). Dalším důležitým antimikrobiálním peptidem je katelicidin LL-37, který má výrazné fungistatické a mírné fungicidní účinky na lipofilní kvasinky (10). Keratinocyty jsou schopné syntetizovat více různých cytokinů a chemokinů, které se dále účastní imunitních reakcí v kůži. Watanabe et al. jako první pomocí enzymové imunisorbentové analýzy (ELISA) ukázali, že kultivace normálních lidských keratinocytů spolu s *Malasseziemi* indukuje sekreci IL-6, IL-1 β , IL-8 a TNF α (71).

U pacientů s atopickým ekzémem může kolonizace kůže touto lipofilní kvasinkou vést ke vzniku IgE zprostředkované senzibilizace. Přecitlivělost na *Malassezii* se zdá být ve skupině houbových alergenů nejdůležitější, především při srovnání s relativně nízkou senzibilizací na *Candida albicans* a *Candida herbarum* (27). V průběhu ekzémového onemocnění se přecitlivělost na mikrobiální alergeny objevuje pravděpodobně později než přecitlivělost na potravinové a inhalační alergeny (27). Uvádí se, že přibližně polovina pacientů s AE je senzibilizována na některý z alergenů *Malassezie*, tyto výsledky významně podporují předpoklad, že lipofilní

kvasinky mohou ovlivňovat exacerbaci ekzémových projevů (10). Bohužel konkrétní role specifických IgE protilátek v patogenezi AE a jejich asociace se závažností ekzému zůstává stále neobjasněna (27).

Atopici reagují obecně na antigeny (alergeny) především prostřednictvím humorální imunitní odpovědi časného typu přecitlivělosti, kterou lze hodnotit *in vivo* kožními prick testy (skin prick tests, SPT) nebo *in vitro* stanovením hladiny specifického IgE. Zdraví lidé a pacienti s jinými dermatózami mívají jen ojediněle pozitivní reakci na antigeny *Malassezie* v těchto testech časné přecitlivělosti (12). Naopak u pacientů s AE se senzibilizace na antigeny *Malassezie* prokazuje často. Její prevalenci hodnotili prostřednictvím stanovení specifického IgE mnozí autoři a jejich výsledky se pohybují v širokém rozmezí: 30 – 60% dospělých s AE (55) a 12 – 15% dětí s AE (41, 55) bylo senzibilizováno na antigeny *Malassezie*. U zdravých osob a u pacientů s jinými dermatózami než AE se frekvence pozitivních specifických IgE na *Malassezii* pohybuje v rozmezí 0 – 1% (35, 55). K podobným výsledkům dospěli i autoři hodnotící prevalenci senzibilizace pomocí prick testů (35). Nejčastěji je dokazována časná přecitlivělost na antigeny *M. globosa*, *M. sympodialis* a *M. restricta*, což odpovídá i výsledkům studií hodnotícím kolonizaci kůže různými druhy *Malassezie* (35). Ukázalo se, že existují významné rozdíly v senzibilizaci na alergeny lipofilních kvasinek v závislosti na lokalizaci ložisek AE. Bylo prokázáno, že pacienti s převažujícím postižením hlavy a krku a horní části trupu mají signifikantně častěji pozitivní specifické IgE proti *Malassezii* než pacienti s AE v jiných lokalizacích (4, 32). Předpokládá se, že příčinou může být rozdílná distribuce kvasinek na kožním povrchu. Na hlavě, krku a v horní části trupu, kde je větší množství mazových žláz mají lipofilní kvasinky vhodnější podmínky k růstu. Laboratorně zjištěná přecitlivělost však ještě nemusí znamenat, že daný alergen je klinicky relevantní při zhoršování AE. Z hlediska hodnocení lipofilních kvasinek jako možných provokačních faktorů AE mají vyšší výpovědní hodnotu studie zaměřující se na účinnost antimykotické terapie u AE. Lokální protikvasinková terapie zánětlivých ložisek AE se zdá být spíše neúčinná (74). Naproti tomu, ve studii zahrnující pacienty s AE v oblasti především hlavy, krku a horní části trupu vedla měsíční perorální antimykotická terapie ketokonazolem 200mg/den k signifikantnímu zlepšení klinických projevů onemocnění ve srovnání se skupinou pacientů s AE na placebo (44).

2 Cíl práce

Atopický ekzém je jednou z nejčastějších imunitně podmíněných kožních chorob. Na našem pracovišti ve spolupráci s Ústavem alergologie a klinické imunologie FN Plzeň jsme doposud u pacientů s AE vyšetřovali přecitlivělost na inhalační nebo potravinové alergeny pomocí prick testů, stanovení hladiny specifických IgE nebo atopy patch testů. Bohužel některé výsledky těchto testů jen omezeně korelují s klinickým obrazem AE a anamnestickými údaji.

V naší práci jsme se jako první v České republice zaměřili na hodnocení přecitlivělosti na antigeny *Malassezie* u pacientů s AE pomocí stanovení sérových hladin specifických IgE protilátek. Naším cílem bylo:

- 1) zjistit výskyt přecitlivělosti na antigeny *Malassezie* u pacientů s AE v České republice a ve Švýcarsku
- 2) porovnat výskyt přecitlivělosti v jednotlivých skupinách pacientů s AE (věkové skupiny; pacienti s atopickou konstitucí; pacienti s postižením především hlavy, krku a horní části trupu, HNAD; podle pohlaví)
- 3) zjistit, zda existuje korelace mezi tíží AE a hodnotami specifického IgE proti antigenům *Malassezie*
- 4) shrnout aktuální data o roli senzibilizace na antigeny *Malassezie* u pacientů s AE a doplnit je o naše výsledky

3 Popis řešení a výsledky výzkumu

3.1 Materiál a metodika

Studie probíhala na Dermatologické klinice v Curychu (Dermatologische Klinik, UniversitätsSpital Zürich) a na Dermatovenerologické klinice Fakultní nemocnice v Plzni od září 2012 do března 2014.

3.1.1 Studijní soubor pacientů

Do studie jsme zařadili celkem 240 pacientů s atopickým ekzémem. Větší část, 173 pacientů (96 žen a 77 mužů), byla zařazena v průběhu mého studijního pobytu na dermatologické klinice v Curychu. V České republice na dermatovenerologické klinice v Plzni bylo vyšetřeno 67 pacientů (40 žen a 27 mužů). Podmínkou pro zařazení pacienta do studie byla přítomnost klinických projevů AE, která byla hodnocena v souladu s Hanifin a Rajka kritérii. Zároveň byla vytvořena podskupina pacientů s postižením především hlavy, krku a horní části trupu (označena jako skupina HNAD).

3.1.2 Hodnocení závažnosti atopického ekzému

U části švýcarských pacientů (u 32 pacientů) byla hodnocena tíže ekzémových projevů pomocí tzv. EASI (Eczema Area and Severity Index). EASI skórovací systém, běžně používaný ve Švýcarsku, hodnotí intenzitu erytému, infiltraci, exkoriace a lichenifikaci a přibližné procentuální postižení povrchu těla.

U všech českých pacientů byla hodnocena závažnost AE pomocí zde častěji používaného SCORAD skórovacího systému. SCORAD oproti EASI zahrnuje i subjektivní potíže nemocného, jako je svědění a rušení spánku (pacient tyto údaje zaznamená na škále od 0 do 10).

3.1.3 Stanovení sérových hladin IgE protilátek

Pacientům zařazeným do studie bylo odebráno sérum ke zjištění hladiny celkových a specifických IgE protilátek. Pro stanovení specifických IgE proti *Malassezii* byl použit antigen m227, což je směs alergenů z 3 různých druhů *Malassezie* (*M. sympodialis*, *M. globosa* a *M. restricta*). Přítomnost specifických IgE proti *Malassezii* byla testována u všech 240 zařazených pacientů. U 143 švýcarských pacientů a 67 českých pacientů byla hodnocena přítomnost atopické konstituce. Atopickou konstituci jsme pro potřeby této studie definovali, jako přítomnost pozitivních specifických IgE proti inhalačním nebo potravinovým alergenům ($\geq 0,35$ kU/l). V séru 133 švýcarských a všech 67 českých pacientů byla také stanovena hladina celkových IgE protilátek. Byl použit systém ImmunoCAP® (ThermoFisher Scientific), pracující na principu fluorescenční enzymové imunoanalýzy (FEIA). Hladina celkového IgE ≥ 100 kU/l byla považována za zvýšenou. Výsledky celkových a specifických IgE nemohly nijak ovlivnit zařazení pacientů do skupin HNAD a non-HNAD (postižení v jiných lokalizacích než hlava, krk a horní část trupu), jelikož v době zařazení pacientů do jednotlivých skupin nebyly tyto výsledky ještě k dispozici.

3.1.4 Statistická analýza

Spojité data s neparametrickou distribucí jsou prezentována jako hodnoty mediánů, variabilita dat je charakterizována intervalem maxima a minima a 1. a 3. kvartilu. Pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit párový Wilcoxonův pořadový test (Mannův – Whitneyův test). Četnost pozitivity byla srovnávána pomocí Fisherova exaktního testu. P-hodnota $< 0,05$ značila statisticky významný rozdíl mezi skupinami. Korelace tíže ekzému (SCORAD/EASI) s hodnotami celkového a specifického IgE byla vypočtena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

3.2 Výsledky

3.2.1 Skupina všech pacientů ve studii: česká + švýcarská

Do studie jsme zařadili celkem 240 pacientů s AE - 136 žen (56,7%) a 104 mužů (43,3%). Věkové rozmezí bylo široké (1–84 let, medián 33 let). Medián celkového IgE byl 524,5 kU/l. Celkové IgE bylo zvýšené (≥ 100 kU/l) u 72,5% pacientů. Pozitivní specifické IgE proti *Malassezii* ($\geq 0,35$ kU/l) bylo zachyceno u 54,2% pacientů. Atopická konstituce, definovaná jako pozitivita specifických IgE k inhalačním nebo potravinovým alergenům, byla zjištěna u 63,3% pacientů z celkového počtu. Na základě klinického obrazu atopického ekzému jsme pacienty rozdělili na dvě skupiny. Postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu (HNAD) trpělo celkem 103 pacientů (42,9%). U 137 pacientů (57,1%) byly přítomny diseminované ekzémové projevy s postižením především trupu a končetin (non-HNAD). U některých pacientů ze skupiny non-HNAD byly přítomny současně i minimální ekzémové projevy na hlavě, zvláště v predilekční lokalizaci AE (oční víčka a retroaurikulárně). Ale tyto pacienti nikdy neměli zasažen krk a projevy na obličej nepostihovali více než 10% povrchu hlavy.

U mužů byly zjištěny významně vyšší hodnoty celkového IgE (p-hodnota < 0,001) a významně častější senzibilizace na antigeny *Malassezie* (p-hodnota = 0,013). Také atopická konstituce se vyskytovala signifikantně častěji u mužů (p-hodnota = 0,006).

Tabulka 3.1 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na pohlaví; skupina všech pacientů: česká + švýcarská (CZ+ŠV)

	Celkem	Ženy	Muži
Pacienti celkem	240	56,7% (136 z 240)	43,3% (104 z 240)
Medián věku (roky)	33	32	36
Věkové skupiny			
1 - 25 let	32,1% (77 z 240)	36% (49 z 136)	26,9% (28 z 104)
26 – 84 let	67,9% (163 z 240)	64% (87 z 136)	73,1% (76 z 104)
Medián celkové IgE (kU/l) ¹	524,5	310	1095,5
		p < 0,001	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l) ¹	72,5% (145 z 200)	66,1% (74 z 112)	80,7% (71 z 88)
		p = 0,26	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	0,565	0,24	0,835
		p = 0,055	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> ($\geq 0,35$ kU/l)	54,2% (131 z 240)	47,1% (64 z 136)	63,5% (66 z 104)
		p = 0,013	
Atopická konstituce ²	63,3% (133 z 210)	55,1% (65 z 118)	73,9% (68 z 92)
		p = 0,006	
HNAD	42,9% (103 z 240)	39% (53 z 136)	48,1% (50 z 104)
		p = 0,188	

¹ Celkové IgE (≥ 100 kU/l) – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 24 žen a 16 mužů)

² Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/ potravinovým alergenům) nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 18 žen a 12 mužů)

sp. IgE – specifické IgE

pokud je p-hodnota < 0,05, jde o statisticky významný rozdíl mezi skupinami

Pacienti ze skupiny HNAD měli signifikantně vyšší hodnoty specifických IgE proti *Malassezii* (p-hodnota = 0,001). Ve skupině HNAD byl také pozorován statisticky nesignifikantní

trend (p-hodnota = 0,067) k častější senzibilizaci na antigeny *Malassezie*. Rozdíly v hodnotách celkového IgE nebyly mezi skupinami HNAD a non-HNAD významné. Ani přítomnost atopické konstituce se významně nelišila u pacientů ze skupiny HNAD a non-HNAD.

Tabulka 3.2 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na lokalizaci projevů AE (HNAD versus non-HNAD); skupina všech pacientů: česká + švýcarská

	HNAD	Non-HNAD
Pacienti celkem	42,9% (103 z 240)	57,1% (137 z 240)
Medián věku (roky)	33	33
Věkové skupiny		
1 - 25 let	31,1% (32 z 103)	32,8% (45 z 137)
26 – 84 let	68,9% (71 z 103)	67,2% (92 z 137)
Medián celkové IgE (kU/l) ¹	874	370,5
	p = 0,1	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100kU/l) ¹	80% (64 z 80)	67,5% (81 z 120)
	p = 0,55	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	3,16	0,25
	p = 0,001	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	61,2% (63 z 103)	48,9% (67 z 137)
	p = 0,067	
Atopická konstituce ²	67,1% (59 z 88)	60,7% (74 z 122)
	p = 0,385	
Pohlaví	Ž 51,5% (53 z 103) M 48,5% (50 z 103)	Ž 60,6% (83 z 137) M 39,4% (54 z 137)

¹ Celkové IgE (≥ 100 kU/l) – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 23 HNAD a 17 non-HNAD)

² Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/ potravinovým alergenům) nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 15 HNAD a 15 non-HNAD)

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin také na základě věku. Mezi děti a mladé dospělé patřilo celkem 77 pacientů (ve věku 1 – 25 let). Skupina starších pacientů (> 25 let) zahrnovala 163 pacientů. Jediným významným rozdílem byly vyšší hodnoty *Malassezie*-specifických IgE u mladších pacientů (p-hodnota = 0,043). Žádné jiné signifikantně významné rozdíly jsme mezi těmito dvěma věkovými skupinami nezaznamenali.

Tabulka 3.3 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na věk; skupina všech pacientů: česká + švýcarská

	0-25 let	> 25 let
Pacienti celkem	32,1% (77 z 240)	67,9% (163 z 240)
Medián věku (roky)	21	42
Pohlaví	Ž 63,6% (49 z 77) M 36,4% (28 z 77)	Ž 53,4% (87 z 163) M 46,6% (76 z 163)
Medián celkového IgE (kU/L) ¹	481	565
	p = 0,657	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l) ¹	73,8% (45 z 61)	72% (100 z 139)
	p = 1,000	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	1,6	0,35
	p = 0,043	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	63,4% (49 z 77)	49,7% (81 z 163)
	p = 0,093	
Atopická konstituce ²	66,7% (44 z 66)	61,8% (89 z 144)
	p = 0,756	
HNAD	41,6% (32 z 77)	43,6% (71 z 163)
	p = 1,000	

¹ Celkové IgE (≥ 100 kU/l) – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů (ve skupině 0 - 25 let nehodnoceno u 16 pacientů, 26 - 84 let nehodnoceno u 24 pacientů)

² Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/ potravinovým alergenům) nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (0 - 25 let nehodnoceno u 11 pacientů, 26 - 84 let nehodnoceno u 19 pacientů)

Atopická konstituce (pozitivní specifické IgE k inhalačním nebo potravinovým alergenům) byla zjištěna u 63,3% pacientů. U těchto pacientů jsme pozorovali signifikantně vyšší hladiny a častější pozitivitu jak celkových IgE tak i *Malassezie*-specifických IgE (p-hodnota < 0,001). Rozdíl v četnosti atopické konstituce u pacientů s HNAD nebo non-HNAD nebyl zaznamenán.

Tabulka 3.4 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na atopickou konstituci; skupina všech pacientů: česká + švýcarská

	Atopická konstituce	Bez atopické konstituce
Pacienti celkem	63,3% (133 z 210)	36,7% (77 z 210)
Medián věku (roky)	33	33
Pohlaví	Ž 48,9% (65 z 133) M 51,1% (68 z 133)	Ž 68,8% (53 z 77) M 31,2% (24 z 77)
Medián celkového IgE (kU/L) ¹	1410	53,1
	p < 0,001	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l) ¹	81,2% (108 z 133)	36,4% (28 z 77)
	p < 0,001	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	3,16	0,001
	p < 0,001	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	72,9% (97 z 133)	26% (20 z 77)
	p < 0,001	
HNAD	44,4% (59 z 133)	37,7% (29 z 77)
	p = 0,385	
Věkové skupiny		
0-25 let	33,1% (44 z 133)	28,6% (22 z 77)
26-84 let	66,9% (89 z 133)	71,4% (55 z 77)

¹ Celkové IgE (≥ 100 kU/l) – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů

² Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/ potravinovým alergenům) nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (0 - 25 let nehodnoceno u 11 pacientů, 26 - 84 let nehodnoceno u 19 pacientů; nehodnoceno u 18 žen a 12 mužů; 15 HNAD a 15 non-HNAD)

3.2.2 Skupina švýcarských pacientů

Do souboru švýcarských pacientů bylo zařazeno celkem 173 pacientů s AE - 96 žen (55,5%) a 77 mužů (44,5%). Medián celkového IgE byl 407 kU/l. Celkové IgE bylo zvýšené (≥ 100 kU/l) u 77,7% pacientů. Pozitivní specifické IgE proti *Malassezii* bylo zachyceno u 49,1% pacientů. Atopická konstituce byla zjištěna u 68,5% pacientů. Muži byli signifikantně častěji senzibilizováni k antigenům *Malassezie* (p-hodnota = 0,033) a také měli signifikantně vyšší hladiny specifických IgE proti *Malassezii* než ženy (p-hodnota = 0,034). U mužů byly zároveň signifikantně častěji zachyceny zvýšené hladiny celkového IgE (p-hodnota = 0,035) a také měli vyšší hodnoty celkového IgE (p-hodnota = 0,001). Atopická konstituce byla také signifikantně častější u mužů než u žen (p-hodnota = 0,011). Muži také signifikantně častěji trpěli postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu (p-hodnota = 0,032).

Tabulka 4.1 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na pohlaví; skupina švýcarských pacientů (ŠV)

	Celkem	Ženy	Muži
Pacienti celkem	173	55,5% (96 z 173)	44,5% (77 z 173)
Medián věku (roky)	37,6	37,3	38,3
Věkové skupiny			
1 - 25 let	28,9% (50 z 173)	28,1% (27 z 96)	29,9% (23 z 77)
26 – 84 let	71,1% (123 z 173)	71,9% (69 z 96)	70,1% (54 z 77)
Medián celkové IgE (kU/l) ¹	407	255	1131
		p = 0,001	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l) ¹	77,7% (94 z 133)	62,5% (45 z 72)	80,3% (49 z 61)
		p = 0,035	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	0,25	0,1	0,57
		p = 0,034	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> ($\geq 0,35$ kU/l)	49,1% (85 z 173)	41,7% (40 z 96)	58,4% (45 z 77)
		p = 0,033	
Atopická konstituce ²	68,5% (98 z 143)	59% (46 z 78)	80% (52 z 65)
		p = 0,011	
HNAD	42,8% (74 z 173)	35,4% (34 z 96)	51,9% (40 z 77)
		p = 0,032	

¹ Celkové IgE (≥ 100 kU/l) – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 24 žen a 16 mužů)

² Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/ potravinovým alergenům) nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 18 žen a 12 mužů)

Postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu (HNAD) trpělo celkem 74 švýcarských pacientů (42,8%). U 99 švýcarských pacientů (57,2%) se jednalo o více generalizované ekzémové projevy s postižením trupu a končetin. Pacienti ze skupiny HNAD ve švýcarském souboru byly signifikantně častěji senzibilizováni na antigeny *Malassezie* (p-hodnota = 0,047) a zároveň měli signifikantně vyšší hodnoty specifických IgE proti *Malassezii* (p-hodnota = 0,001). Pacienti s postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu měli také významně častěji zvýšené hladiny celkového IgE (p-hodnota = 0,03). Pozorovali jsme pouze trend, který nebyl statisticky signifikantní (p-hodnota = 0,061), k vyšším hodnotám celkového IgE ve skupině HNAD. Atopická konstituce se vyskytovala přibližně stejně často u obou skupin (HNAD a non-HNAD).

Tabulka 4.2 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na přítomnost HNAD formy; skupina švýcarských pacientů

	HNAD	Non-HNAD
Pacienti celkem	42,8% (74 z 173)	57,2% (99 z 173)
Medián věku (roky)	37,5	37,6
Věkové skupiny		
1 - 25 let	27% (20 z 74)	30,3% (30 z 99)
26 – 84 let	73% (54 z 74)	69,7% (69 z 99)
Medián celkové IgE (kU/l) ¹	637	295
	p = 0,061	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100kU/l) ¹	82,4% (42 z 51)	63,4% (52 z 82)
	p = 0,030	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	1,3	0,13
	p = 0,001	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	58,1% (43 z 74)	42,4% (42 z 99)
	p = 0,047	
Atopická konstituce ²	71,2% (42 z 59)	66,7% (56 z 84)
	p = 0,589	
Pohlaví	Ž 46% (34 z 74) M 54% (40 z 74)	Ž 62,6% (62 z 99) M 37,4% (37 z 99)

¹ Celkové IgE – nebylo hodnoceno u 40 šv. pacientů (nehodnoceno u 23 HNAD a 17 non-HNAD)

² Atopická konstituce nebyla hodnocena u 30 šv. pacientů (nehodnoceno u 15 HNAD a 15 non-HNAD)

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin také na základě věku. Mezi děti a mladé dospělé patřilo 50 pacientů (ve věku 4–25 let, z toho 9 dětí bylo předpubertálních - mladších 12 let). Ve švýcarské skupině bylo 123 pacientů starších 25-ti let. Atopická konstituce byla signifikantně častěji zjištěna ve skupině dětí a mladých dospělých (p-hodnota = 0,024). Žádné jiné signifikantně významné rozdíly jsme mezi těmito dvěma věkovými skupinami nezaznamenali.

Tabulka 4.3 – Klinická charakteristika pacientů s ohledem na věk; skupina švýcarských pacientů

	0-25 let	> 25 let
Pacienti celkem	28,9% (50 z 173)	71,1% (123 z 173)
Medián věku (roky)	18,6	45,5
Pohlaví	Ž 54% (27 z 50) M 46% (23 z 50)	Ž 56,1% (69 z 123) M 43,9% (54 z 123)
Medián celkového IgE (kU/L) ¹	368	453
	p = 0,316	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l) ¹	64,7% (22 z 34)	72,7% (72 z 99)
	p = 0,378	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	0,64	0,23
	p = 0,322	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	56% (28 z 50)	46,3% (57 z 123)
	p = 0,497	
Atopická konstituce ²	84,6% (33 z 39)	62,5% (65 z 104)
	p = 0,024	
HNAD	40% (20 z 50)	43,9% (54 z 123)
	p = 1,000	

¹ Celkové IgE – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů (ve skupině 0 - 25 let nehodnoceno u 16 pacientů, 26 - 84 let nehodnoceno u 24 pacientů)

² Atopická konstituce nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (0 - 25 let nehodnoceno u 11 pacientů, 26 - 84 let nehodnoceno u 19 pacientů)

Pozitivní specifické IgE k inhalačním nebo potravinovým alergenům bylo zjištěno u 68,5% švýcarských pacientů. U těchto pacientů jsme pozorovali signifikantně vyšší hladiny a častější pozitivitu celkových IgE i *Malassezie*-specifických IgE (p-hodnota < 0,001).

Tabulka 4.4 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na atopickou konstituci; skupina švýcarských pacientů

	Atopická konstituce	Bez atopické konstituce
Pacienti celkem	68,5% (98 z 143)	31,5% (45 z 143)
Medián věku (roky)	37,2	41,4
Pohlaví	Ž 46,9% (46 z 98) M 53,1% (52 z 98)	Ž 71,1% (32 z 45) M 28,9% (13 z 45)
Medián celkového IgE (kU/L)	1226	44,35
	p < 0,001	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l)	76,5% (75 z 98)	22,2% (10 z 45)
	p < 0,001	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	1,52	0
	p < 0,001	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	68,4% (67 z 98)	11,1% (5 z 45)
	p < 0,001	
HNAD	42,9% (42 z 98)	37,8% (17 z 45)
	p = 0,589	
Věkové skupiny		
0-25 let	33,7% (33 z 98)	13,3% (6 z 45)
26-84 let	66,3% (65 z 98)	86,7% (39 z 45)

Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/potravinovým alergenům) nebyla hodnocena u 30 švýcarských pacientů (0 - 25 let nehodnoceno u 11 pacientů, 26 - 84 let nehodnoceno u 19 pacientů; nehodnoceno u 18 žen a 12 mužů; 15 HNAD a 15 non-HNAD)

Tíže atopického ekzému, pomocí EASI skórovacího systému, byla hodnocena pouze u 32 švýcarských pacientů. Medián EASI byl 23,1. Většina pacientů dle těchto výsledků trpěla mírnou až středně těžkou formou ekzému. V této skupině nebyl zjištěn žádný signifikantně významný vztah mezi tíží ekzému (EASI) a hodnotami specifického IgE proti *Malassezii* nebo hladinami celkového IgE.

3.2.3 Skupina českých pacientů

Do souboru českých pacientů bylo zařazeno celkem 67 pacientů s AE - 40 žen (59,7%) a 27 mužů (40,3%). Medián celkového IgE byl 893 kU/l. Celkové IgE bylo zvýšené (≥ 100 kU/l) u 76,1% pacientů. Pozitivní specifické IgE proti *Malassezii* bylo zachyceno u 67,2% pacientů. Atopická konstituce byla zjištěna u 52,2% pacientů. Při srovnání českých pacientů podle pohlaví nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Tabulka 5.1 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na pohlaví; skupina českých pacientů

	Celkem	Ženy	Muži
Pacienti celkem	67	59,7% (40 z 67)	40,3% (27 z 67)
Medián věku (roky)	29	24,5	32
Věkové skupiny			
1 - 25 let	40,3% (27 z 67)	55% (22 z 40)	18,5% (5 z 27)
26 – 84 let	59,7% (40 z 67)	45% (18 z 40)	81,5% (22 z 27)
Medián celkové IgE (kU/l)	893	425,5	1060
		p = 0,062	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100kU/l)	76,1% (51 z 67)	72,5% (29 z 40)	81,5% (22 z 27)
		p = 0,561	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	3,34	3,39	2,49
		p = 0,697	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	67,2% (45 z 67)	60% (24 z 40)	77,8% (21 z 27)
		p = 0,186	
Atopická konstituce	52,2% (35 z 67)	47,5% (19 z 40)	59,3% (16 z 27)
		p = 0,455	
SCORAD medián	21	21,5	21
HNAD	43,3% (29 z 67)	47,5% (19 z 40)	37% (10 z 27)
		p = 0,457	

Postižením převážně hlavy, krku a horní části trupu (HNAD) trpělo celkem 29 českých pacientů (43,3%). U zbývajících 38 pacientů (56,7%) se jednalo o více generalizované ekzémové projevy s postižením trupu a končetin. Mezi českými skupinami HNAD a non-HNAD nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Tabulka 5.2 - Klinická charakteristika pacientů s ohledem na přítomnost HNAD; skupina českých pacientů

	HNAD	Non-HNAD
Pacienti celkem	43,3% (29 z 67)	56,7% (38 z 67)
Medián věku (roky)	31	28
Věkové skupiny		
1 - 25 let	41,4% (12 z 29)	39,5% (15 z 38)
26 – 84 let	58,6% (17 z 29)	60,5% (23 z 38)
Medián celkové IgE (kU/l)	970	686,5
		p = 0,854
Zvýšené celkové IgE (≥ 100kU/l)	75,9% (22 z 29)	76,3% (29 z 38)
		p = 1,000
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	4,78	2,27
		p = 0,339
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	69% (20 z 29)	65,8% (25 z 38)
		p = 1,000
Atopická konstituce	58,6% (17 z 29)	47,4% (18 z 38)
		p = 0,461
SCORAD medián	23	19
Pohlaví	Ž 65,5% (19 z 29) M 34,5% (10 z 29)	Ž 55,3% (21 z 38) M 44,7% (17 z 38)

Mezi děti a mladé dospělé patřilo 27 pacientů (40,3%); (ve věku 1–25 let, z toho pouze 2 děti byli předpubertální - mladší 12 let). Do skupiny pacientů starších 25 let patřilo 40 pacientů (59,7%). Mezi těmito dvěma věkovými skupinami také nebyly v českém souboru pacientů zjištěny žádné významné rozdíly.

Tabulka 5.3 – Klinická charakteristika pacientů s ohledem na věk; skupina českých pacientů

	1-25 let	>25 let
Pacienti celkem	40,3% (27 z 67)	59,7% (40 z 67)
Medián věku (roky)	21	37,5
Pohlaví	Ž 81,5% (22 z 27) M 18,5% (5 z 27)	Ž 45% (18 z 40) M 55% (22 z 40)
Medián celkového IgE (kU/L)	738	931,5
	p = 0,868	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l)	85,2% (23 z 27)	70% (28 z 40)
	p = 0,243	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	4,92	1,01
	p = 0,098	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	77,8% (21 z 27)	60% (24 z 40)
	p = 0,186	
Atopická konstituce	40,7% (11 z 27)	60% (24 z 40)
	p = 0,142	
SCORAD medián	17	22,5
HNAD	44,4% (12 z 27)	42,5% (17 z 40)
	p = 1,000	

Pozitivní specifické IgE proti inhalačním nebo potravinovým alergenům bylo zjištěno u 52,2% českých pacientů. U těchto pacientů jsme pozorovali signifikantně vyšší hladiny a častější pozitivitu celkových IgE i *Malassezie*-specifických IgE. Žádný rozdíl v četnosti atopické konstituce u pacientů s HNAD nebo non-HNAD nebyl zaznamenán.

Tabulka 5.4 - Klinická charakteristika českých pacientů s ohledem na atopickou konstituci

	Atopická konstituce	Bez atopické konstituce
Pacienti celkem	52,2% (35 z 67)	47,8% (32 z 67)
Medián věku (roky)	32	25,5
Pohlaví	Ž 54,3% (19 z 35) M 45,7% (16 z 35)	Ž 65,6% (21 u 32) M 34,4% (11 z 32)
Medián celkového IgE (kU/L)	2910	142
	p < 0,001	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100 kU/l)	94,3% (33 z 35)	56,3% (18 z 32)
	p < 0,001	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	7,64	0,25
	p < 0,001	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	85,7% (30 z 35)	46,9% (15 z 32)
	p = 0,001	
SCORAD medián	32	12
HNAD	48,6% (17 z 35)	37,5% (12 z 32)
	p = 0,461	
Věkové skupiny		
0-25 let	31,4% (11 z 35)	50% (16 z 32)
26-84 let	68,6% (24 z 35)	50% (16 z 32)

U všech českých pacientů jsme jednorázově, v době odběru séra ke stanovení IgE protilátek, zhodnotili tíži atopického ekzému. Použili jsme skórovací systém SCORAD. Medián SCORAD byl 21. Mírná forma AE (SCORAD < 25 bodů) se vyskytovala u 38 pacientů, středně závažná forma (SCORAD 25 – 50 bodů) byla diagnostikována u 19 pacientů, těžkou formu AE (SCORAD > 50 bodů, maximum může dosahovat 103 bodů) trpělo 10 pacientů. V naší studii byl nejzávažněji postižen pacient se SCORAD 92. Mezi většinou skupin (muži X ženy, HNAD X non-HNAD, mladší X starší pacienti) nebyl významný rozdíl v hodnotách SCORAD. Jen ve skupině pacientů s atopickou konstitucí byly hodnoty SCORAD významně vyšší. Byla prokázána korelace mezi hodnotami celkového IgE a *Malassezie*-specifického IgE a tíží atopického ekzému. Tato korelace se vyskytovala jen při použití skórovacího systému SCORAD u českých pacientů. Vztah mezi EASI u švýcarských pacientů a hodnotami IgE protilátek nebyl zjištěn.

3.2.4 Porovnání pacientů; česká versus švýcarská skupina

Při porovnání výsledků mezi českou a švýcarskou skupinou pacientů bylo zjištěno několik statisticky významných rozdílů. U českých pacientů byly významně vyšší hladiny (p-hodnota < 0,001) a častější pozitivita *Malassezie*-specifického IgE (p-hodnota = 0,014). Naopak u švýcarských pacientů byla častější atopická konstituce (p-hodnota = 0,031).

Tabulka 6.1- Klinická charakteristika pacientů v české versus švýcarské skupině

	Celkem	Švýcarsko	Česká republika
Pacienti celkem	240	173	67
Medián věku (roky)	33	37,6	29
Věkové skupiny 1 - 25 let	32,1% (77 z 240)	28,9% (50 z 173)	40,3% (27 z 67)
26 - 84 let	67,9% (163 z 240)	71,1% (123 z 173)	59,7% (40 z 67)
Medián celkového IgE (kU/l)	524,5	407	893
		p = 0,097	
Zvýšené celkové IgE (≥ 100kU/l)	72,5% (145 z 200)	77,7% (94 z 133)	76,1% (51 z 67)
		p = 0,503	
Medián sp. IgE <i>Malassezie</i> (kU/l)	0,565	0,25	3,34
		p < 0,001	
Pozitivní sp. IgE <i>Malassezie</i> (≥ 0,35 kU/l)	54,2% (131 z 240)	49,1% (85 z 173)	67,2% (45 z 67)
		p = 0,014	
Atopická konstituce	63,3% (133 z 210)	68,5% (98 z 143)	52,2% (35 z 67)
		p = 0,031	
HNAD	42,9% (103 z 240)	42,8% (74 z 173)	43,3% (29 z 67)
		p = 1,000	

¹ Celkové IgE (≥ 100 kU/l) – nebylo hodnoceno u 40 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 24 žen a 16 mužů, u 23 HNAD a 17 non-HNAD)

² Atopická konstituce (pozitivní sp IgE proti inhalačním/ potravinovým alergenům) nebyla hodnoceno u 30 švýcarských pacientů (nehodnoceno u 18 žen a 12 mužů; 15 HNAD a 15 non-HNAD)

sp. IgE – specifické IgE

Pokud je p-hodnota < 0,05, jde o statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

4 Diskuse

Podstata poškození bariérové funkce kůže je velmi pestrá, vzniká mimo jiné na podkladě zvýšeného pH, snížené antimikrobiální sekrece, porušeného filaggrinu a snížené produkce potu (57). Nižší činnost antimikrobiálních peptidů (např. katalicidin LL-37, β -defenzin HBD-2) podporuje růst *Malassezie* a alkalické pH může stimulovat uvolňování antigenů z *Malassezií* (57). Na masivní kolonizaci *Malassezií* odpovídají keratinocyty, které produkují Th2 cytokiny a chemokiny a aktivují lokální antigen prezentující buňky (APC). Aktivované APC (např. Langerhansovy buňky) následně prezentují antigeny *Malassezie* T-lymfocytům. Tato interakce mezi T lymfocyty a APC vyvolává kaskádu reakcí s produkcí dalších Th2 cytokinů, chemokinů a zvýšením exprese adhezivních molekul. To vede k přílivu leukocytů do oblastí, které jsou masivně kolonizovány *Malassezií*. Dochází ke vzniku klinicky patrného zánětu, který může být podkladem ekzémových změn v oblasti hlavy, krku a horní části trupu (HNAD) (14). Během tohoto procesu jsou pomocí APC a Th2 cytokinů aktivovány i B lymfocyty. Dochází k následné produkci *Malassezie*-specifických IgE protilátek.

Tabulka 7 – Shrnutí předpokládaného vlivu *Malassezie* na zhoršování ekzémových projevů

	Funkce kůže u AE	Kolonizace <i>Malassezií</i>
Kožní bariéra	<ul style="list-style-type: none"> • poškozena různými faktory (např. deficit filaggrinu) • umožňuje prezentaci <i>Malassezie</i> imunitnímu systému (17) 	<ul style="list-style-type: none"> • produkce <i>Malassezie</i>-specifických IgE protilátek (56)
pH	<ul style="list-style-type: none"> • zvýšení pH • snížená alkalirezistence 	<ul style="list-style-type: none"> • alkalické pH stimuluje růst <i>Malassezií</i> a zvyšuje expresi alergenů (57)
Efekt na keratinocyty		<ul style="list-style-type: none"> • aktivace APC • produkce Th2 cytokinů • up-regulace chemokinů a adhezivních molekul

Tabulka 8 - Důkazy účasti kvasinek rodu *Malassezia* na patogenezi atopického ekzému (10)

U pacientů s atopickým ekzémem:
<ul style="list-style-type: none"> • signifikantně častější senzibilizace na alergeny <i>Malassezií</i> než u zdravých osob (55)
<ul style="list-style-type: none"> • epikutánní aplikace alergenů <i>Malassezií</i> vede často k vývoji ekzémových projevů (32)
<ul style="list-style-type: none"> • buněčná imunitní odpověď na antigeny <i>Malassezií</i> má převážně charakter Th2
<ul style="list-style-type: none"> • při převažujícím postižení hlavy a krku mívá často pozitivní efekt protikvasinková terapie (61)

Atopický ekzém má multifaktoriální etiologii, je proto velmi nepravděpodobné, že by imunologická reakce proti *Malassezií* byla jediným spouštěcím faktorem u HNAD formy. Přesto se uvažuje o tom, že senzibilizace na antigeny *Malassezie* může ekzémové projevy zhoršovat. Neexistují přesvědčivé důkazy, že kůže pacientů s AE je více kolonizována *Malassezií*, nebo kolonizována jinými druhy *Malassezie*, ve srovnání s kůží pacientů se seborhoickou dermatitidou nebo kůží zdravých lidí. V minulosti bylo mnoho studií zaměřeno na hledání případných rozdílných znaků v kolonizaci *Malassezií* u pacientů s AE ve srovnání se zdravou populací (21, 29,

46, 54, 59). Publikované výsledky zůstávají stále kontroverzní. Švédská studie zjistila, že kůže zdravých lidí je *Malassezií* kolonizována více než kůže pacientů s AE (54). Důvodem může být i snížené množství kožních lipidů u pacientů s AE, které jsou zásadní pro růst *Malassezie*. Také byl popsán kontroverzní vztah mezi výsledky kultivace a výsledky vyšetření specifických IgE protilátek. U daného pacienta nebyly nalezeny specifické IgE protilátky proti konkrétnímu vykultivovanému druhu *Malassezie*, ale byly přítomny protilátky proti druhům, které nebyly kultivací zjištěny (54, 60). Tyto rozdíly vznikají pravděpodobně proto, že *Malassezie* obsahují jak druhově specifické alergenní komponenty tak také komponenty společné pro více druhů (60). Obecnou příčinou mnoha rozdílných závěrů může být i problematické odebrání vzorků, obtížná *in vitro* kultivace a identifikace antigenů různých druhů *Malassezie*.

Je známo, že ve srovnání se zdravou populací je u pacientů s atopickou konstitucí větší pravděpodobnost alergické odpovědi po expozici jakémukoli alergenu (14). Některé studie prokázaly, že pacienti s AE reagovali častěji na antigeny *Malassezie* v prick testech a také vykazovali vyšší hladiny *Malassezie*-specifických IgE protilátek při srovnání s kontrolní zdravou skupinou (12, 32, 35, 38, 58). V rozsáhlé švýcarské studii z roku 2006 bylo zjištěno, že senzibilizace proti antigenům *Malassezie* se vyskytuje jak u extrinzitní, tak i u intrinzitní formy AE (12). U intrinzitní formy atopického ekzému bývají nízké hodnoty celkového IgE a chybí specifické IgE proti inhalačním nebo potravinovým alergenům. Tato definice odpovídá naší skupině pacientů bez atopické konstituce. V naší práci jsme se cíleně pojmu intrinzitní forma AE vyhnuli, jelikož se nyní ve světové literatuře zdůrazňuje komplexní etiologie AE a doporučuje se tyto dvě formy (intrinzitní – nealergická a extrinzitní – alergická) od sebe takto striktně neoddělovat. V našem souboru pacientů bez atopické konstituce (tzn. bez prokázané senzibilizace na potravinové nebo inhalační alergeny) byla zjištěna přecitlivělost na *Malassezii* u 26% pacientů. Hladiny celkového IgE i *Malassezie*-specifických IgE byly ale výrazně nižší než u skupiny s atopickou konstitucí. Švýcarští autoři také zjišťovali přecitlivělost proti *Malassezii* u pacientů s jinými typy alergických onemocnění (např. kopřivka, kontaktní alergický ekzém, alergická rinitida, astma), ale jen u pacientů s AE byla zjištěna senzibilizace na antigeny *Malassezie* (12). V kontrolní skupině zdravých pacientů, bez jakéhokoli alergického onemocnění, také nebyla přecitlivělost proti *Malassezii* prokázána (12). IgE zprostředkovaná senzibilizace byla jen ojediněle zjištěna u pacientů se seborhoickou dermatitidou (28). Výzkum zaměřený na rozdíly mezi pacienty z podskupiny HNAD a pacienty s AE v jiných lokalizacích ukázal, že pacienti s postižením převážně hlavy a krku vykazují častěji pozitivní reakci na antigeny *Malassezie* v prick testech a mají vyšší hodnoty *Malassezie*-specifických IgE protilátek (4, 32, 39, 69). Toto koresponduje i s našimi výsledky. V průběhu jedné z větších studií, která zahrnula 589 pacientů, byly detekovány pozitivní *Malassezie*-specifické IgE protilátky dokonce u 100% pacientů z podskupiny HNAD, u pacientů s AE v jiné lokalizaci byly tyto protilátky zjištěny jen u 13% (19). Naše výsledky nejsou zdaleka tak přesvědčivé. V naší studii, zahrnující celkem 240 pacientů, byly pozitivní *Malassezie*-specifické IgE zjištěny u 61,2% pacientů ze skupiny HNAD a u 48,9% pacientů ze skupiny non-HNAD.

Udává se, že u 50% dětí (18) a 80% dospělých s AE (65) se nachází zvýšené hladiny celkového IgE. V naší studii se zvýšené hladiny celkového IgE vyskytovaly u 72,5% pacientů, častěji u mužů, bez rozdílu věku a lokalizace ekzémových projevů. Některé studie naznačují korelaci mezi hodnotami celkového IgE a tíží atopického ekzému (42, 52, 67, 73). Jiní autoři korelaci celkových IgE s tíží AE spíše vylučují (34). Bylo také zjištěno, že u mnoha pacientů s vysokými hladinami celkových IgE nedochází ke zlepšení klinického nálezu AE ani po léčbě anti-IgE protilátkami (40). Několik předcházejících studií dokonce potvrdilo korelaci mezi hladinami *Malassezie*-specifických IgE a tíží atopického ekzému (4, 26, 37, 39, 76). Tyto údaje se v naší práci nepodařilo přesvědčivě potvrdit. Při použití EASI skórovacího systému u švýcarské skupiny pacientů nebyl pozorován žádný vztah mezi tíží ekzému a hodnotami *Malassezie*-specifických IgE nebo celkových IgE. Tento výsledek mohl být ovlivněn menším množstvím pacientů (32 pacientů), u kterých bylo EASI stanoveno. Při použití SCORAD systému u českých pacientů (67 pacientů) byla naopak patrná korelace mezi tíží ekzémových projevů a hodnotami jak

Malassezie-specifických IgE, tak i celkových IgE. Možná korelace celkových nebo specifických IgE s tíží ekzémových projevů zůstává u pacientů s AE stále kontroverzní. Nicméně, obecně se předpokládá, že u závažnějšího ekzémového postižení je i větší pravděpodobnost vzniku senzibilizace k různým alergenům. Naproti tomu, korelace mezi hustotou kolonizace *Malassezií*, která byla zjišťována pomocí PCR metody, a tíží AE nebyla prokázána (63).

Studie s kožními prick testy (Skin Prick Tests, SPT) a specifickými IgE ozřejmují humorální reakci imunitního systému na antigeny *Malassezie*, která je zprostředkovaná především B lymfocyty. Epikutánní testy (Atopy Patch Tests, APT) prokazují buněčnou imunitní odpověď na antigen, zprostředkovanou T lymfocyty. Buněčná imunitní odpověď je zásadní pro rozvoj ekzému, u kterého se jedná především o reakci pozdní přecitlivělosti, ale v případě AE může docházet také ke vzniku specifických IgE protilátek (47). Použití APT ke zjišťování přecitlivělosti na antigeny *Malassezie* zůstává kontroverzní. Některé práce naznačují, že APT jsou více specifické než testy časné přecitlivělosti (SPT, specifické IgE) (16). Ve studii amerických autorů byla ale prokázána nižší senzitivita APT při prokazování přecitlivělosti na antigeny *Malassezie* (14). Někteří autoři žádné zásadní rozdíly mezi výsledky získanými v APT a specifickými IgE nezaznamenali (12, 49). Uvažuje se o tom, že celková nebo lokální protikvasinková terapie by mohla být více efektivní u pacientů s pozitivní reakcí v APT, které demonstrují přecitlivělost pozdního typu (49).

Rozporuplné výsledky dřívějších studií jsou pravděpodobně způsobeny rozdíly při kultivaci *Malassezií*, podmínkami při uchovávání extraktů a také výběrem různých antigenů z různých druhů *Malassezie*. Stabilita extraktů *Malassezie* je velmi nízká, doba uchovávání vzorků by neměla překročit jeden měsíc a měly by být skladovány při teplotě +4°C (43). Při klinickém testování by měly být použity extrakty s co nejvyšším obsahem antigenních proteinů, aby bylo sníženo riziko falešně negativních výsledků. V průběhu naší studie byla k testování specifických IgE protilátek použita směs tří různých druhů *Malassezií* (m227). Takto je možné zachytit přecitlivělost na *Malassezii* u více pacientů ve srovnání s analýzou specifických IgE protilátek jen proti *Malassezia sympodialis* (m70).

Senzibilizace na *Malassezii* je popisována u 12 – 27% dětí (37, 41, 55) a u 29 – 65% dospělých (12, 53). Častější přecitlivělost u dospělých vzniká pravděpodobně na základě delšího trvání onemocnění s větší pravděpodobností rozvoje polyvalentní senzibilizace (67). Finská studie, která sledovala dětskou populaci s AE a potravinovou alergií v průběhu deseti let, prokázala, že těžká forma AE a potravinová alergie diagnostikována v prvních letech života jsou rizikové faktory pro případný následný rozvoj senzibilizace proti *Malassezii* (37). Také bylo prokázáno, že děti senzibilizované proti *Malassezii* měly signifikantně vyšší hodnoty celkového IgE (37, 41). V našem souboru pacientů byly paradoxně prokázány signifikantně vyšší hodnoty *Malassezie*-specifických IgE protilátek (p -hodnota = 0,043) u pacientů mladších 25 let. Rozdíly v hodnotách celkového IgE jsme nepozorovali.

5 Závěr

U více než poloviny pacientů zařazených do naší studie byly zjištěny pozitivní *Malassezie*-specifické IgE protilátky. Bylo potvrzeno, že muži, pacienti s HNAD a mladší 25ti-let byli buď častěji senzibilizováni na antigeny *Malassezie* nebo měli vyšší hladiny *Malassezie*-specifických IgE protilátek. Je známo, že aktivita mazových žláz je vyšší u mužů a v seboroických oblastech, jako je hlava, krk, horní část trupu. Naše výsledky plně korespondují s těmito údaji.

Vzhledem k již prokázaným skutečnostem je přecitlivělost na *Malassezii* možné očekávat především u pacientů s AE a

- 1) projevy lokalizovanými na hlavě, krku a horní části trupu;
- 2) při exacerbacích ekzémových projevů v pubertě a mladém dospělém věku, kdy je zvýšená činnost mazových žláz;

3) u závažného postižení, odolávajícímu běžným způsobům léčby (14).

Reakce na *Malassezii* je pravděpodobně zprostředkovaná buněčnou i humorální imunitou. Je naprosto zřejmé, že IgE zprostředkovaná přecitlivělost proti *Malassezii* není jediným spouštěcím faktorem při rozvoji atopického ekzému. Domníváme se, že může hrát významnou roli při zhoršování projevů. Existuje úzký vztah mezi přítomností *Malassezie* na povrchu kůže a faktory zásadními pro rozvoj AE, jako jsou zvýšené pH nebo porušená bariérová funkce (23, 28). Potlačení nebo úplná eliminace tohoto spouštěcího mikrobiálního faktoru, pomocí vhodných antimykotik (3, 61), může pomoci tlumit zánětlivou reakci kůže a tím vést ke zlepšení klinického obrazu AE.

Naše studie v některých aspektech potvrzuje výsledky předchozích citovaných prací, ale zároveň jako první popisuje rozsáhlou populaci ze střední Evropy (Švýcarsko a Česká republika), se zaměřením na rozdíly mezi pacienty s HNAD a non-HNAD. Dřívější práce popisovali stav populace s AE v jiných světových oblastech (např. Skandinávie (37, 54), USA (14), Asie (76)). Rozvíjející se možnosti molekulární biologie a genetiky bez pochyby v budoucnu odkryjí nové poznatky o stále ne úplně jasném vztahu *Malassezie* a kožních chorob. Tato nová zjištění by v praxi mohla přinést rozšíření našich terapeutických možností u chronických zánětlivých kožních onemocnění, jako je AE.

6 Seznam použité literatury

1. AHMAD-NEJAD, P., MRABET-DAHBI, S., BREUER, K., et al. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol*, 2004;113(3):565-567.
2. AYHAN, M., SANCAK, B., KARADUMAN, A., et al. Colonization of neonate skin by *Malassezia* species: relationship with neonatal cephalic pustulosis. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(6):1012-1018.
3. BACK, O., BARTOSIK, J. Systemic ketoconazole for yeast allergic patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15:34-38.
4. BAYROU, O., PECQUET, C., FLAHAULT, A., et al. Head and neck atopic dermatitis and *Malassezia-furfur*-specific IgE antibodies. *Dermatology* 2005;211(2):107-13.
5. BERGMANN, R.L., EDENHARTER, G., BERGMANN, K.E., et al. Atopic dermatitis in early infancy predicts allergic airway disease at 5 years. *Clin Exp Allergy*. 1998 Aug;28(8):965-970.
6. BIEBER, T., NOVAK, N. Pathogenesis of atopic dermatitis: new developments. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;9(4):291-294.
7. BOZEK, A., FISHER, A., FILIPOWSKA, B., et al. Clinical features and immunological markers of atopic dermatitis in elderly patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(4):372-378.
8. BRAUN – FALCO, O., PLEWIG, G., WOLF, H., et al. *Dermatology* 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2009.
9. BUCHVALD, D. Lipofilné kvasinky rodu *Malassezia* a choroby kože. I. Seboroická dermatitída. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 2010;59(3):119-125.
10. BUCHVALD, D. Lipofilné kvasinky rodu *Malassezia* a choroby kože. II. Atopická dermatitída. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 2010;59(4):197-204.
11. CARDONA, I.D., CHO, S.H., LEUNG, D.Y. Role of bacterial superantigens in atopic dermatitis: implications for future therapeutic strategies. *Am J Clin Dermatol*. 2006;7(5):273-279.
12. CASAGRANDE, B.F., FLÜCKIGER, S., LINDER, M.T., et al. Sensitization to the yeast *Malassezia sympodialis* is specific for extrinsic and intrinsic atopic eczema. *J Invest Dermatol*. 2006 Nov;126(11):2414-2421.
13. COTTERILL, J.A., CUNLIFFE, W.J., WILLIAMSON, B., et al. Age and sex variation in skin surface lipid composition and sebum excretion rate. *Br J Dermatol*. 1972 Oct;87(4):333-340.

14. DARABI, K., HOSTETLER, S.G., BECHTEL, M.A., et al. The role of *Malassezia* in atopic dermatitis affecting the head and neck of adults. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Jan;60(1):125-136.
15. DARSOW, U., LAIFAOU, J., KERSCHENLOHR, K., et al. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a European multicenter study. *Allergy.* 2004;59(12):1318-1325.
16. DARSOW, U., VIELUF, D., RING, J. Evaluating the relevance of aeroallergen sensitization in atopic eczema with the atopy patch test: a randomized, double-blind multicenter study. Atopy Patch Test Study Group. *J Am Acad Dermatol.* 1999 Feb;40(2 Pt 1):187-193.
17. DE BENEDETTO, A., KUBO, A., BECK, L.A. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol.* 2012 Mar;132(3 Pt 2):949-963.
18. DE BENEDETTIS, F.M., FRANCESCHINI, F., HILL, D., et al; EPAAC Study Group. The allergic sensitization in infants with atopic eczema from different countries. *Allergy.* 2009 Feb;64(2):295-303.
19. DEVOS, S.A., VAN DER VALK, P.G. The relevance of skin prick tests for *Pityrosporum ovale* in patients with head and neck dermatitis. *Allergy* 2000 Nov;55(11):1056-1058.
20. EICHSTEDT, E. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep neue Notizen aus dem Gebiete der Natur und Heilkunde.* 1846;39:270-271.
21. FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis and fungi. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):545-563.
22. FARR, P.M., KRAUSE, L.B., MARKS, J.M., et al. Response of scalp psoriasis to oral ketoconazole. *Lancet* 1985;2:921-922.
23. FIGUEREDO, L.A., CAFARCHIA, C., DESANTI, S., et al. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet Microbiol* 2012; 160: 126-131.
24. FÖLSTER-HOLST, R., PAPE, M., BUSS, Y.L., et al. Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients. *Allergy.* 2006 May;61(5):629-632.
25. GAITANIS, G., VELEGRAKI, A., MAYSER, P., et al. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2013 Jul-Aug;31(4):455-463.
26. GLATZ, M., BUCHNER, M., VON BARTENWERFFER, W., et al. *Malassezia* spp.-specific Immunoglobulin E Level is a Marker for Severity of Atopic Dermatitis in Adults. *Acta Derm Venereol.* 2014 Apr 3.
27. GUPTA, A.K., BATRA, R., BLUHM, R., et al. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol.* 2004 Nov;51(5):785-98.
28. GUPTA, A.K., KOHLI, Y., FAERGEMANN, J., et al. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol.* 2001 Apr;39(2):199-206.
29. GUPTA, A.K., KOHLI, Y., SUMMERBELL, R.C., et al. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol.* 2001 Jun;39(3):243-51.
30. IRVINE, A.D., MCLEAN, W.H., LEUNG, D.Y. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2011 Oct 6;365(14):1315-1327.
31. JAGIELSKI, T., RUP, E., ZIÓLKOWSKA, A., et al. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol.* 2014 Mar 7;14:3.

32. JOHANSSON, C., SANDSTRÖM, M.H., BARTOSIK, J., et al. Atopy patch test reactions to *Malassezia* allergens differentiate subgroups of atopic dermatitis patients. *Br J Dermatol.* 2003 Mar;148(3):479-488.
33. JOHANSSON, S., BIEBER, T., DAHL, R., et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):832–836.
34. KAMINISHI, K., SOMA, Y., KAWA, Y., et al. Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. *J Dermatol Sci.* 2002 May;29(1):19-25.
35. KATO, H., SUGITA, T., ISHIBASHI, Y., et al. Detection and quantification of specific IgE antibodies against eight *Malassezia* species in sera of patients with atopic dermatitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol Immunol* 2006;50(11):851-856.
36. KATSAROU, A., ARMENAKA, M. Atopic dermatitis in older patients: particular points. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 Jan;25(1):12-18.
37. KEKKI, O.M., SCHEYNIUS, A., POIKONEN, S., et al. Sensitization to *Malassezia* in children with atopic dermatitis combined with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013 May;24(3):244-249.
38. KIEFFER, M., BERGBRANT, I.M., FAERGEMANN, J., et al. Immune reactions to *Pityrosporum ovale* in adult patients with atopic and seborrheic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 1990;22:739-749.
39. KIM, T.Y., JANG, I.G., PARK, Y.M., et al. Head and neck dermatitis: the role of *Malassezia furfur*, topical steroid use and environmental factors in its causation. *Clin Exp Dermatol* 1999 May;24(3):226-231.
40. KRATHEN, R.A., HSU, S. Failure of omalizumab for treatment of severe adult atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2005 Aug;53(2):338-340.
41. LANGE, L., ALTER, N., KELLER, T., et al. Sensitization to *Malassezia* in infants and children with atopic dermatitis: prevalence and clinical characteristics. *Allergy.* 2008 Apr;63(4):486-487.
42. LASKE, N., NIGGEMANN, B. Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum IgE levels? *Pediatr Allergy Immunol.* 2004 Feb;15(1):86-88.
43. LINTU, P., SAVOLAINEN, J., KALIMO, K., et al. Stability of *Pityrosporum ovale* allergens during storage. *Clin Exp Allergy* 1998 Apr;28(4):486-490.
44. LINTU, P., SAVOLAINEN, J., KORTEKANGAS-SAVOLAINEN, O., et al. Systemic ketoconazole is an effective treatment of atopic dermatitis with IgE-mediated hypersensitivity to yeasts. *Allergy.* 2001;56(6):512-517.
45. MORTZ, C., ANDERSEN, K. New aspects in allergic contact dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):428-432.
46. NAKABAYASHI, A., SEI, Y., GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol.* 2000 Oct;38(5):337-341.
47. NEWELL, L., POLAK, M.E., PERERA, J., et al. Sensitization via healthy skin programs Th2 responses in individuals with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2013 Oct;133(10):2372-2380.
48. PEDROSA, A.F., LISBOA, C., RODRIGUES, A.G. *Malassezia* infections: A medical conundrum. *J Am Acad Dermatol.* 2014 Feb 22.
49. RAMIREZ DE KNOTT, H.M., MCCORMICK, T.S., KALKA, K., et al. Cutaneous hypersensitivity to *Malassezia sympodialis* and dust mite in adult atopic dermatitis with a textile pattern. *Contact Dermatitis* 2006 Feb;54(2):92-99.
50. ROSENBERG, E.W., BELEW, P.W. Improvement of psoriasis of the scalp with ketoconazole. *Arch Dermatol* 1982;118:370-371.

- 51.SAKI, N., JOWKAR, F., ALYASEEN, S. Comparison of sertaconazole 2% cream versus hydrocortisone 1% ointment in the treatment of atopic dermatitis. *J Dermatolog Treat.* 2013 Dec;24(6):447-449.
- 52.SALT, B.H., BOGUNIEWICZ, M., LEUNG, D.Y. Severe refractory atopic dermatitis in adults is highly atopic. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Feb;119(2):508-509.
- 53.SANDSTRÖM FALK, M.H., FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis in adults: does it disappear with age? *Acta Derm Venereol.* 2006;86(2):135-139.
- 54.SANDSTRÖM FALK, M.H., TENGVALL LINDER, M., JOHANSSON, C., et al. The prevalence of *Malassezia* yeasts in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic dermatitis and healthy controls. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(1):17-23.
- 55.SCALABRIN, D.M., BAVBEK, S., PERZANOWSKI, M.S., et al. Use of specific IgE in assessing the relevance of fungal and dust mite allergens to atopic dermatitis: a comparison with asthmatic and nonasthmatic control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Dec;104(6):1273-1279.
- 56.SELANDER, C., ENGBLOM, C., NILSSON, G., et al. TLR2/MyD88-dependent and -independent activation of mast cell IgE responses by the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *J Immunol.* 2009 Apr 1;182(7):4208-4216.
- 57.SELANDER, C., ZARGARI, A., MÖLLBY, R., et al. Higher pH level, corresponding to that on the skin of patients with atopic eczema, stimulates the release of *Malassezia sympodialis* allergens. *Allergy.* 2006 Aug;61(8):1002-1008.
- 58.SCHMID-GRENDELMEIER, P., SCHEYNIUS, A., CRAMERI, R. The role of sensitization to *Malassezia sympodialis* in atopic eczema. *Chem Immunol Allergy* 2006;91:98-109.
- 59.SUGITA, T., TAJIMA, M., AMAYA, M., et al. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004;48(10):755-759.
- 60.SUGITA, T., TAJIMA, M., TSUBUKU, H., et al. Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. *Microbiol Immunol* 2006;50(7):549-552.
- 61.SVEJGAARD, E., LARSEN, P.O., DELEURAN, M., et al. Treatment of head and neck dermatitis comparing itraconazole 200 mg and 400 mg daily for 1 week with placebo. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18:445-449.
- 62.ŠTORK, J., ARENBERGER, P., PIZINGER, K., et al. *Dermatovenerologie*. 1. vydání, Praha: Galén, 2008.
- 63.TAKAHATA, Y., SUGITA, T., KATO, A., et al. Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br J Dermatol.* 2007;157(6):1178-1182.
- 64.TARAZOOIE, B., KORDBACHEH, P., ZAINI, F., et al. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatol.* 2004 May 1;4:5.
- 65.TOKURA Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2010 Apr;58(1):1-7.
- 66.TRABELSI, S., OUESLATI, J., FEKIH, N., et al. Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor. *Tunis Med.* 2010 Feb;88(2):85-87.
- 67.VAKIRLIS, E., LAZARIDOU, E., TZELLOS, T.G., et al. Investigation of cytokine levels and their association with SCORAD index in adults with acute atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 Apr;25(4):409-416.
- 68.VOSMÍK, F., SKOŘEPOVÁ, M. *Dermatomykózy – Diagnostika a terapie dermatologických mykotických infekcí*. 1. vydání, Praha: Galén, 1995.
- 69.WAERSTED, A., HJORTH, N. *Pityrosporum orbiculare* – a pathogenic factor in atopic dermatitis of the face, scalp and neck? *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1985;114:146-148.
- 70.WALLEY, A., CHAVANAS, S., MOFFATT, M., et al. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet.* 2001;29(2):175-178.

71. WATANABE, S., KANO, R., SATO, H., et al. The effects of Malassezia yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2001;116(5):769-773.
 72. WEIDINGER, S., KLOPP, N., RUMMLER, L., et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(1):177-184.
 73. WILLIAMS, H., FLOHR, C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jul;118(1):209-213.
 74. WONG, A.W., HON, E.K., ZEE, B. Is topical antimycotic treatment useful as adjuvant therapy for flexural atopic dermatitis: randomized, double-blind, controlled trial using one side of the elbow or knee as a control. *Int J Dermatol.* 2008 Feb;47(2):187-191.
 75. ZARGARI, A., MIDGLEY, G., BÄCK, O., et al. IgE-reactivity to seven Malassezia species. *Allergy.* 2003;58(4):306-311.
 76. ZHANG, E., TANAKA, T., TAJIMA, M., et al. Anti-Malassezia-Specific IgE antibodies Production in Japanese Patients with Head and Neck Atopic Dermatitis: Relationship between the Level of Specific IgE Antibody and the Colonization Frequency of Cutaneous Malassezia Species and Clinical Severity. *J Allergy.* 2011; 2011:645670.
-

7 Přehled publikační činnosti autora

- 1) IgE-Mediated Sensitization to Malassezia in Atopic Dermatitis: More Common in Male Patients and in Head and Neck Type. **Brodská P**, Panzner P, Pizinger K, Schmid-Grendelmeier P. *Dermatitis.* 2014 May-Jun;25(3):120-6.
- 2) Kopřivka – klasifikace, diagnostika, léčba. **Brodská P**. *Čes-slov dermat*, 89, 2014, No.2, p. 55-64
- 3) Treatment of severe cold contact urticaria with omalizumab: case reports. **Brodská P**, Schmid-Grendelmeier P. *Case Rep Dermatol.* 2012 Sep;4(3):275-80. doi: 10.1159/000346284. Epub 2012 Dec 20.
- 4) Rychle progredující onemocnění pojiva u ženy středního věku. **Brodská P**, Čelakovský J, Cetkovská P. *Dermatologie pro praxi.* 2012;6(4).
- 5) Klinický případ: Bělavá ložiska s hemoragickými puchýři na hrudníku. **Brodská P**, Pizinger K. *Čes-slov Derm*, 86, 2011, No.6, p.285-287.
- 6) A Comprehensive Analysis of Middle-European Molecular Sensitization Profiles to Pollen Allergens. Panzner P, Vachová M, Vítovcová P, **Brodská P**, Vlas T. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;164:74-82 (DOI:10.1159/000362760)
- 7) An asymptomatic annular patch on the palm. Tatarkova I, Cetkovska P, **Brodská P**, Pizinger K. *Clin Exp Dermatol.* 2013 Nov 26. doi: 10.1111/ced.12224.
- 8) Bronchial inflammation in seasonal allergic rhinitis with or without asthma in relation to natural exposure to pollen allergens. Panzner P, Malkusová I, Vachová M, Liška M, **Brodská P**, Růžičková O, Malý M. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2013 Sep 25. pii: S0301-0546(13)00194-8. doi: 10.1016/j.aller.2013.06.009. [Epub ahead of print]
- 9) Digital dermatoscopic follow-up of 1027 melanocytic lesions in 121 patients at risk of malignant melanoma. Fikrle T, Pizinger K, Szakos H, **Panznerova P**, Divisova B, Pavel S. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013 Feb;27(2):180-6. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04438.x. Epub 2012 Jan 5.

8 Přednášky na odborných setkáních

- 1) Stevens-Johnsonův syndrom. *III. SNOWDERM* – 26. - 27. 2. 2011
- 2) Diagnostika alergenů u atopického ekzému. *Západočeský seminář, Plzeň* – 28. 4. 2011
- 3) The diagnosis of hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *EAACI Allergy School, Krakow, Polsko* – 18. – 21. 8. 2011
- 4) Behcet disease. *Summer School for Residents, Praha* – 15. – 17. 9. 2011
- 5) Nežádoucí kožní lékové reakce vyvolané antibiotickou terapií. *Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Plzeň* - 21. – 23. 9. 2011
- 6) Dapson a jeho použití. *Večer kožní kliniky, Plzeň* – 9. 11. 2011
- 7) Antihistaminika. *Kurz IPVZ, Praha* – 9. 12. 2011
- 8) Role Malassezia-specifických IgE v patogenezi atopického ekzému. *53. Studentská vědecká konference, Plzeň* – 24. 4. 2013
- 9) EBV hepatitis and gout tophi in a patient with severe psoriasis under anti-TNF treatment. *Salzburg Medical Seminars, Rakousko* – 16. – 22. 6. 2013
- 10) Laboratorní diagnostika u atopického ekzému a kopřivky. *Kurz IPVZ, Praha* – 25. 10. 2013
- 11) Antihistaminika, Dapson. *Kurz IPVZ, Praha* – 6. 12. 2013
- 12) Komplikace biologické terapie – kazuistika, *Západočeský seminář, Plzeň* – 10. 4. 2014