AKNE LEZYONLARINDAN İZOLE EDİLEN PROPIONIBACTERIUM ACNES SUŞLARINDA ERİTROMİSİN DİRENCİ

ERYTHROMYCIN RESISTANCE IN PROPIONIBACTERIUM ACNES STRAINS ISOLATED FROM LESIONS OF PATIENTS WITH ACNE VULGARIS

Çağrı ERGİN, Şeniz ERGİN**, Güler YAYLI***, Vahide BAYSAL***

ÖZET: Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Polikliniğine başvurarak akne vulgaris tanısı alan hastalardan izole edilen Propionibacterium acnes suşlarında eritromisin direnci agar dilüsyon yöntemi ile araştırıldı. Akne vulgaris şikayeti ile başvuran 257 hastanın 126'sından (%49.02) P. acnes izole edildi. İzole edilen 126 suşun 9'u (%7.14) eritromisine dirençliydi. Eritromisinin $MİK_{90}$ değeri 1 µg/ml olarak saptandı. Sonuçlarımız, akne lezyonlarından izole edilen P. acnes suşlarının genellikle eritromisine duyarlı olduğunu göstermektedir, ancak tedavi başarısızlıklarında dirençli suşların da olabileceği düşünülmelidir.

Anahtar kelimeler: Eritromisin, Propionibakteri, akne.

SUMMARY: In this study, the erythromycin resistance of Propionibacterium acnes strains isolated from patients with acne vulgaris, who admitted to Dermatology Outpatient Clinics of Süleyman Demirel University Medical School, were investigated by the agar dilution method. Of 257 patients, 126 strains (49.02%) of P. acnes were isolated and 9 (7.14%) of them were resistant to erythromycin. Erythromycin MIC_{90} level was found to be 1 µg/ml. Although P. acnes isolated from acne lesions are generally susceptible to erythromycin, the presence of erythromycin resistant strains should be kept in mind in case of therapeutic failure in acne vulgaris.

Key words: Erythromycin, Propionibacteria, acne.

* Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Isparta.

*** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta.

Geliş Tarihi: 19.10.1999 Kabul Ediliş Tarihi: 8.12.1999

GİRİŞ

Propionibacterium acnes Gram pozitif, pleomorfik yapı gösteren, sporsuz anaerop bir bakteridir[1]. Sağlıklı insan cilt florasında bulunabilir ve akne patogenezinde rol oynar. Makrolid antibiyotiklerin topikal formülasyonlarının kullanıma başlanmasıyla birlikte değişik ülkelerden eritromisine dirençli Propionibacterium varlığı bildirilmiştir[2]. Akne tedavisindeki başarısızlıklardan cilt florasında yer alan eritromisine dirençli propionibakteriler sorumlu tutulmaktadır.

Eritromisinin oral preparatları tüm dünyada uzun süredir kullanmaktadır. Ülkemizde ise topikal formülasyon saf olarak bulunmamaktadır ancak benzoil peroksit ile birlikte kombine preparasyonu 1998 yılından itibaren uygulamaya sunulmuştur. Dolayısıyla bu ilacın kısa sürede yaygın olarak kullanılacağı bir gerçektir. Bu çalışma, ülkemizde topikal makrolid antibiyotiklerin kullanımının yayılması öncesinde akne şikayeti ile başvuran hastaların cilt florasından izole edilen P. acnes suşlarında eritromisin direncini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dermatoloji Polikliniğine Mart 1998 – Ağustos 1999 tarihleri arasındaki 18 aylık dönemde akne şikayeti ile başvuran hastalar çalışmaya alındı. Son bir ay içinde herhangi bir nedenle antibiyotik kullanan, oral veya topikal akne tedavisi alan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışma grubunu 257 hasta oluşturdu.

Cilt flora bakterilerinin toplanmasında Williamson ve Kligman tarafından tanımlanan deterjanla fırçalama tekniği kullanıldı[3]. Örnekler özel hazırlanan taşıma solüsyonunda (%0.1 Tween 80 içeren 0.075 M PBS, pH: 7.9) ıslatılan eküvyon ile cilt yüzeyine hafif bastırarak (silgi ile yazı siler kuvvetinde) 4 cm^2'lik bir alandan, eküvyon ile 4-5 defa yüzey fırçalanması şeklinde toplandı[4]. Toplanan örnekler taşıma solüsyonu içinde en fazla 2 saat içinde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler Brewer'in tiyoglikolat besiyerinde 36.5 °C'da 5 gün süresince bekletildi. Bu sürenin sonunda üremenin görüldüğü besiyeri steril Pasteur pipeti ile alınarak bileşiminde %3 (w/v) glukoz ve 2 µg/ml furazolidon (Sigma Chemical Co, UK) bulunan "Brain Heart" infüzyon agara (BHIA) ekildi. Bu besiyerinde bulunan furazolidon cilt florasında yer alan stafilokok ve mikrokokların üremesini inhibe etmektedir. Plaklar 36.5°C'da anaerobik ortamda 7 gün inkübe edildi. Üreyen bakterilerin tiplendirilmesinde koloni morfolojisi, aerotolerans testi, Gram boyama, katalaz varlığı ve indol yapımı incelendi[1,5].

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri BHIA besiyerinde agar dilüsyon yöntemi ile araştırıldı. İzole edilen bakteri suşları BHI sıvı besiyerinde süspanse edildi. Değişen dilüsyonlarda eritromisin içeren agar dilüsyon plakları BHI sıvı besiyeri kullanılarak 0.03 ile 1024 µg/ml sınırları arasında hazırlandı.

Süspanse edilmiş olan bakteriler ekim öncesinde inokulümün damlasında 10^4 koloni oluşturan bakteri yoğunluğunda seyreltildi ve otomatik kalibre pipet ile ekildi[6,7]. Plaklar 36.5 °C'da 5 gün süresince anaerobik ortamda inkübe edildi. Her suş için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kaydedildi.

BULGULAR

Akne vulgaris tanısı alan 257 hastanın 126'sından (%49.02) P. acnes izole edildi. Ortalama yaşı 18.3 ± 3.5 yıl (SE:0.3) olan hastaların 51'i (%40.4) erkek, 75'i (%59.6) kadındı.

İzole edilen 126 P. acnes suşunun 9'u (%7.14) eritromisine dirençli bulundu. $MİK_{50}$ değeri ≤ 0.03 µg/ml ve MIK_{90} değeri 1 µg/ml olarak ölçüldü. Bakteri suşlarının MİK dağılımları ve gösterdikleri fenotipik sınıflama grupları Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I: Akne Vulgarisli Hastalardan İzole Edilen P. acnes Suşlarının Eritromisin Direnci ve Fenotipik Sınıflaması[2,12]

Fenotipik Direnç Sınıfı		MIK (µl/ml)	n	%
Duyarlı		≤ 0.03	110	92.8
		0.06	1	
		0.125	3	
		0.25	2	
		0.5	1	
Dirençli	Sınıf III (Düşük seviye)	1	4	5.6
		2	3	
		4	0	0.0
		8	0	
		16	0	
		32	0	
		64	0	
		32	0	
		64	0	
	Sınıf IV (Sadece Makrolid)	128	0	0.8
		256	1	
		512	0	
	Sınıf I (Yapısal)	≥ 1024	1	0.8

TARTIŞMA

İnsan cilt mikroflorasındaki tek anaerobik bakteri cinsi propionibakterilerdir. Pilosebase ünitelerin orta-alt kısımlarında yerleşerek mikroaerofil veya sebum salgıları ile tıkanan kanalların altındaki anaerop ortamlarda bulunurlar. P.acnes'in

hem kendi yapılarının hem de ortama salgıladığı mediatörlerin inflamasyona yol açtığı şeklinde hipotezler vardır[2,8]. Topikal antibiyotik uygulaması, mevcut propionibakteri sayısını azaltarak tedaviye yardımcı olmaktadır. Antibiyotiğe dirençli propionibakterilerin ortaya çıkması ile birlikte akne tedavisinde başarısızlıklar meydana gelmiştir[7]. Tek veya çoklu antibiyotik direnci İngiltere, Fransa, Almanya, Japonya, ABD ve Yeni Zelanda'dan bildirilmiştir[2]. Bu direnç çoğunlukla eritromisine karşıdır.

Akne vakalarında başarılı klinik cevabın alınmasına karşın en önemli sorun, propionibakterilerin cilt florasında varlıklarını devam ettirmeleridir[2,9]. Bu devamlılık direk veya çapraz antibiyotik direncinin oluşmasına yol açabilmektedir. Aynı zamanda subinhibitör eritromisin konsantrasyonu, bakteriyel ekspresyona neden olarak tedaviyi olumsuz etkileyecek dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açmaktadır[10]. Cilt, antibakteriyellere karşı direncin aktarılmasında önemli bir vücut bölgesidir[11].

Eritromisine karşı direnç genel olarak dört fenotip altında değerlendirilir. Bu değerlendirme çapraz direnci kriter alan MLS (Makrolid - Linkozamid – Streptogramin B) paneline göredir. MLS antibiyotiklerin işlevsel özelliklerinin benzerliğine karşın direnç mekanizmaları farklıdır. Eritromisin için 1024 µg/ml ve üstündeki MİK değerleri yapısal (Sınıf I) MLS direnci olarak kabul edilmektedir. Sınıf II direnç, akne nedeni olarak kabul edilmeyen Propionibacterium granulosum'da görülmektedir. Düşük düzeyli (1-2 µg/ml) eritromisin direnci sınıf III direnç grubunu oluşturur. Sınıf IV direnç grubu 128-256 µg/ml arasındadır ve sadece makrolid antibiyotiklere direnci göstermektedir[2,12].

Makrolid bir antibiyotik olan eritromisin saf topikal formülasyon olarak uzun süredir yurtdışında kullanımdadır. Bu saf preparasyonların direnç gelişimini artırdığı düşünülerek kombine preparasyonlar üretilmiştir. Ülkemizde 1998 yılı başında eritromisin benzoil peroksit ile birlikte kombine şekilde kullanıma sunulmuştur. Ancak topikal kombine formülasyonların antibiyotik direnç gelişimine etkisi tartışmalıdır[9,13,14].

Eady ve arkadaşları[15], antibiyotik tedavisi alan hastaların cilt florasındaki bakterilerin dörtte birinde direncin ortaya çıktığını göstermişlerdir. Akne hastaları arasında eritromisin dirençli propionibakterilerin varlığı ve yayılması bu nedenle kolaylaşabilmektedir[2,9,11].

Japonya'dan yayınlanan bir çalışmada, 15 yıl süreyle yapılan bakteriyolojik takiplerde, eritromisinin 1976 yılında 0.025 µg/ml olan $MİK_{80}$ değerlerinin, 0.39 µg/ml'ye değiştiği gözlenmiştir[16]. Yine aynı ülkeden daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da eritromisin direnci bildirilmektedir[17,18]. Araştırıcılar, 1999 yılında eritromisin $MİK_{80}$ değerini 0.05 µg/ml olarak bulduklarını ve bu değişkenliğin, Japonya'da eritromisinin akne tedavisinde kullanılmamasından kaynaklandığını belirtmektedirler[18]. Ancak oral olarak da olsa uzun süreli eritromisin tedavisinin,

ciltteki flora bakterileri direncine olan etkisinin sorgulanması gereklidir. Nitekim Tan ve arkadaşları[19], sistemik eritromisin tedavisi alan akne hastalarının cilt florasından izole edilen propionibakterilerin daha yüksek MİK değerlerine sahip olduğunu belirtmişlerdir ancak bu sonuç istatistiki olarak desteklenmemiştir.

Ülkemizde cilt florasını oluşturan anaerop bakterilerin varlığı ile ilgili bulabildiğimiz ilk çalışma Özsan ve Mutlu tarafından 1974 yılında yayınlanmıştır[20]. Ancak hem anaerop şartlarda çalışmanın güçlüğü hem de ülkemizde akne tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin laboratuvar araştırmalarında ikinci planda kalması, anaerop cilt florası ile ilgili incelemelerin zorluklarını oluşturmaktadır. Araştırmalar çoğunlukla floranın belirlenmesi üzerine olmuş, çeşitli cilt florası bakterilerinin değişik antibiyotiklere ilaç dirençleri bildirilmiştir[21,22]. Sunulan çalışmada akne şikayeti ile başvuran hastaların cilt floralarından izole edilen P.acnes suşlarında eritromisin direnci %7.14 oranında bulunmuştur. İngiltere'de bu oranın %20.6 olduğu belirtilmektedir[2]. Tesbit etmiş olduğumuz $MİK_{50}$ değeri yurtdışından bildirilen sonuçlarla uyum göstermekle birlikte $MİK_{90}$ değeri daha yüksektir[14-16,23]. Bu değerler, ülkemizde topikal antibiyotik kullanımının protokoller ile düzenlenmesi ihtiyacını vurgulamaktadır. Eady ve arkadaşları[2,15] çalışmalarında, antibiyotiğe dirençli propionibakterilerin hastalar arasında yayılmasının engellenmesinde en etkili yolun, akne için antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmesi olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, akne tedavisinde antibiyotikler tercih edilecek ilk ilaç değildir. Ülkemizde topikal formu yeni kullanıma giren ve öncelikle kullanılabilecek bir antibiyotik konumuna gelen eritromisine karşı dirençli P.acnes suşları tespit etmemiz nedeniyle, tedavi başarısızlıkları ile karşılaşılabileceği ve mevcut direncin kontrol altına alınmasının gerekli olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Marples RR, McGinley KJ: Corynebacterium acnes and other anaerobic diptheroids from human skin. J Med Microbiol 1974, 7: 349-357.
2. Eady EA: Bacterial resistance in acne. Dermatology 1998, 196: 59-66.
3. Williamson P, Kligman AM: A new method for the quantitative investigation of cutaneous propionibacteria. J Invest Dermatol 1968, 45: 498-503.
4. Larson EL, McGinley KJ, Foglia AR, Talbot GH, Leyden JJ: Composition and antimicrobic resistance of skin flora in hospitalized and healty adults. J Clin Microbiol 1986, 23: 604-608.
5. Howard BJ, Keiser JF: Anaerobic bacteria, p.383-424. In: Howard BJ, Keiser JF, Weissfeld AS, Smith TF, Tilton RC, Comerford JC (Eds), Clinical and Pathogenic Microbiology. 1994, 2nd ed. Mosby Company, St. Louis.
6. Baron EJ, Peterson MD, Finegold SM: Methods for testing antimicrobial effectiveness, p.168-188. In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 1994, 9th ed. Mosby Company, St Louis.
7. Eady EA, Cove JH, Blake J, Holland KT, Cunliffe WJ: Recalcitrant acne vulgaris. Clinical, biochemical and microbiological investigation of patients not responding to antibiotic treatment. Br J Dermatol 1988, 118: 415-423.

8. Cunliffe WJ: The sebaceous glands and acne-40 years on. Dermatology 1998, 196: 9-15.
9. Eady EA, Bojar RA, Jones CE, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ: The effects of acne treatment with a combination of benzoyl peroxide and erythromycin on skin carriage of erythromycin-resistant propionibacteria. Br J Dermatol 1996, 134: 107-113.
10. Weisblum B: Inducible erythromycin resistance in bacteria. Br Med Bull 1984, 40: 47-53.
11. Parry EJ, Griffiths CM: Bacteria and antimicrobial agents in the treatment of acne. Int J Dermatol 1996, 35: 249-251.
12. Eady EA, Ross JI, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ: Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in cutaneous propionibacteria: Definition of phenotypes. J Antimicrob Chemother 1989, 23: 493-502.
13. Eady EA, Farmery MR, Ross JI, Cove JH, Cunliffe WJ: Effects of benzoyl peroxide and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients. Br J Dermatol 1994, 31: 331-336.
14. Ergin Ş, Ergin Ç, Baysal V, Yaylı G: Benzoyl peroxide alone and with topical erythromycin against Propionibacterium acnes in acne vulgaris. J Eur Acad Dermatol Venereol 1999, 12 (Suppl 2): S142.
15. Eady EA, Jones CE, Tipper JL, Cove JH, Cunliffe WJ, Layton AM: Antibiotic resistant propionibacteria in acne: Need for policies to modify antibiotic usage. BMJ 1993, 306: 555-556.
16. Kurokawa I, Nishijima S, Asada Y: The antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes: A 15-year bacteriological study and retrospective evaluation. J Dermatol 1988, 15: 149-154.
17. Nishijima S, Kurokawa I, Kawabata S: Sensitivity of Propionibacterium acnes isolated from acne patients: Comparative study of antimicrobial agents. J Int Med Res 1996, 24: 473-477.
18. Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S: Antimicrobial susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris. Eur J Dermatol 1999, 9: 25-28.
19. Tan HH, Goh CL: Antibiotic sensitivity of Propionibacterium acnes isolates studied in a skin clinic in Singapore. Arch Dermatol 1999, 135: 723.
20. Özsan K, Mutlu G: Aknelerden izole edilen iki Corynebacterium acnes suşu. Mikrobiyol Bült 1974, 8: 176-177.
21. Gündüz K, Sivrel A, Türel A, Özbakkaloğlu B: Akne vulgariste antibiyotik direnci. T Klin J Dermatol 1998, 8: 90-93.
22. Kasımoğlu Ö, Gürler N, Hepyüksel G: Aknelerden izole edilen bakteriler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1987, 17: 125-130.
23. Vogt K, Hermann J, Blume U, et al: Comparative activity of the topical quinolone OPC-7251 against bacteria associated with acne vulgaris. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992, 11: 943-945.