

AKNE VULGARİS HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN *PROPIONIBACTERIUM ACNES* SUŞLARININ BİYOTİPLENDİRİLMESİ

BIOTYPING OF *PROPIONIBACTERIUM ACNES* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH ACNE VULGARIS

Çağrı ERGİN*, İlknur KALELİ*, Rasim ŞAHİN***
Şeniz ERGİN**, Nida KAÇAR**

ÖZET: Akne vulgaris etiyopatogeneğinde başlıca etken bakteri *Propionibacterium acnes*'dir. Ülkemizde antibiyotiklere dirençli *P.acnes* oranı %10'un altındadır. Bu çalışmada, bölgemizdeki akne vulgaris'li hastalardan izole edilen *P.acnes* suşlarının biyotiplendirilmesi ve biyotip dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Dermatoloji Polikliniğine başvuran ve akne vulgaris tanısı alan 64 hastadan (18 erkek, 46 bayan; yaş ortalaması 19 ± 3.1 yıl) izole edilen *P.acnes* suşları dahil edilmiştir. Biyotiplendirme, izolatların şekere (sorbitol, eritritol, riboz) özgül pH değişimlerinin ölçülmesiyle yapılmış, sonuçlar hastaların global akne skorları ve akne tipleri ile karşılaştırılmıştır. Test edilen 64 *P.acnes* izolatının 40'ı (%62.5) biyotip I, 3'ü (%4.7) biyotip II, 20'si (%31.3) biyotip III ve 1'i (%1.6) biyotip IV olarak tanımlanmış, biyotip V saptanmamıştır. Hastaneye en sık başvuran akne vulgaris olguları, papülopüstüller ve nodülokistik tabloya sahip olanlardır. Dolayısıyla *P.acnes* suşlarında direnç oranını saptamak ve bu amaçla da toplum taraması yapmak önem taşımaktadır. Toplumda en şiddetli akne reaksiyonu oluşturan suşların *P.acnes* biyotip III olduğu göz önüne alındığında, çalışmamızda saptanan %31.3 oranı yadsınamayacak düzeydedir. Sonuç olarak, bu durumun akne hastalarına uygulanacak antibiyotik tedavisinde dikkate alınması gerektiği kanısındayız.

Anahtar sözcükler: Akne vulgaris, *Propionibacterium acnes*, biyotiplendirme.

ABSTRACT: *Propionibacterium acnes* is the main bacterial etiologic agent in acne vulgaris pathogenesis. The rate of antibiotic resistant *P.acnes* isolates is less than 10% in our country. The aim of this study was to biotype *P.acnes* strains which were isolated from acne vulgaris patients and to investigate the biotype distribution in our region. *P.acnes* isolates from 64 patients (18 male, 46 female; mean age 19 ± 3.1 years) were included in the study and biotyped by sugar-specific pH changes using sorbitol, erythritol and ribose. Results were compared with the global acne grading scores and clinical types of the patients.

* Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

** Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Denizli.

The frequency rates of *P.acnes* biotypes were found as follows; 40 strains (62.5%) were biotype I, 3 (4.7%) were biotype II, 20 (31.3%) were biotype III and one (1.6%) was biotype IV, whereas biotype V was not detected. The acne cases who were admitted to dermatology outpatient clinics mostly complained of papulopustules and nodulocystic lesions. Therefore the detection of antibiotic resistance rates of *P.acnes* strains by mass screening of the community has a growing importance. Since *P.acnes* biotype III is the main biotype which causes the most severe acne reactions, the 31.3% rate of frequency found in our study, can not be overlooked. As a result, this data should be considered as a guide while prescribing antibiotics for the treatment of acne patients.

Key words: Acne vulgaris, Propionibacterium acnes, biotyping.

GİRİŞ

Akne vulgaris, özellikle puberte döneminde androjenlerin etkisiyle sebum üretiminde artış, duktal hiperkornifikasyon ve pilosebace ünitelerinde bulunan *Propionibacterium acnes*'in de rol aldığı inflamasyon sonucu görülen inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Eş zamanlı olarak retinoidler, hormonlar ve büyüme faktörleri de akne de etkendir^{1,2}.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda akne vulgaris etkeni olarak izole edilen *P.acnes* suşlarında antibiyotik direnci %10'un altında bildirilmektedir^{3,4}. Diğer bakterilerde olduğu gibi *P.acnes* için de antibiyotik direncini artıran en önemli faktör yaygın antibiyotik kullanımıdır⁵. Özellikle *P.acnes* biyotip III'ün etken olduğu, nodül ve kistik yapılar ile seyir gösteren akne formlarında topikal antibiyotiklerin dokuya penetrasyonu zayıftır. Bu formların tedavisinde antibiyotik dışı terapötikler kullanılmaktadır⁶. Akne tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin yaygın reçete edilebildiği bir dönemde yaptığımız taramalarda antibiyotik dirençli *P.acnes* oranının artmış olmaması akne etkeni suşların biyotiplerinin bu sonuçta etkili olabileceğini düşündürmektedir. Sunulan çalışmada akne vulgaris hastalarından izole edilen *P.acnes* suşlarının biyotiplendirilmesi ve biyotip dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, akne vulgaris hastalarından izole edilen 64 *P.acnes* suşu dahil edildi. Son 4 hafta içinde herhangi bir nedenle antibiyotik kullanan hastalar çalışmaya alınmadı. Örnekler, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Dermatoloji Polikliniğine başvuran ve akne vulgaris tanısı alan hastalardan deterjan fırçalama tekniği ile toplandı⁷. Hastaların 4 cm²'lik alın bölgesinden, toplama solüsyonu (0.075 M, pH: 7.9, %0.1 Tween 80 içeren PBS) ile alınan örnekler Brewer'in tiyoglikolatlı besiyeri içinde 5 gün süre ile 37°C'de inkübe edildi. Gözle görülen üremenin olduğu bölgeden 2 µg/ml furazolidon içeren TYEG agar (2 g/ml tripton, 1 g/ml maya özütü, 5 g/ml glukoz, 15 g/ml agar) besiyerine ekim yapıldı⁸. Yapılan ekimler anaerob şartlarda, 7 gün süre ile 37°C'de inkübe edildi. Katalaz oluşturan,

indol pozitif, Gram pozitif differoidler *P.acnes* olarak tanımlandı⁹. Eritromisin, klindamisin, tetrasiklin ve doksisisiklin antibiyotik duyarlılık testleri Wilkins-Chalgren agar besiyerinde agar dilüsyon yöntemi ile yapılan suşlar %15 gliserol içeren "Brucella-Broth" besiyeri (Acumedia 7121A) içinde -20°C'de saklandı⁸. Testlerde kullanılan antibiyotikler üretici firmalardan sağlandı.

P.acnes izolatlarının biyotiplendirilmesi için sorbitol, eritritol ve riboz şekerleri kullanıldı. İzolatlar stoklardan TYEG agara pasajlanarak 7 gün 37°C'de anaerob inkübasyonda bırakıldı. Test karbonhidratlarını incelemek için temel besiyeri (Trypticase %1, maya özütü %0.3, kalp ekstresi %0.3, NaCl %0.2, l-sistein HCl %0.03, Tween 80 %0.025, pH: 7.0) hazırlandı. Test edilecek suşlar besiyerine ekilerek üzeri steril mineral yağ ile kapatıldı. 37°C'de bir hafta inkübe edilen kültürlerin süre sonundaki pH değerleri ölçüldü. Eş zamanlı olarak şeker içermeyen besiyerlerine de ekilen aynı suşların inkübasyon sonrası pH değerleri ölçüldü. Suşların her şeker için şekere özgül pH (SpH) değeri aşağıdaki formüle göre saptandı^{10,11}.

$$\text{SpH} = (\text{Şekerli besiyerinin pH'ı} - \text{Şekerli besiyerinin kültür sonrası pH'ı}) - (\text{Temel besiyerinin pH'ı} - \text{Temel besiyerinin kültür sonrası pH'ı})$$

Elde edilen değer 0.35'den büyük olması durumunda test sonucu olumlu kabul edilerek Tablo I'e göre biyotiplendirme yapıldı¹⁰.

Tablo I. *P.acnes* Suşlarının Biyotiplendirme Kriterleri¹⁰

Biyotip	Riboz	Eritritol	Sorbitol
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	+
IV	+	-	-
V	-	-	-

Hastaların başvurusu esnasında akne şiddetinin klinik değerlendirilmesinde global akne derecelendirme (GAGs) yöntemi kullanıldı¹². *P.acnes* biyotipleri, GAGs skoru ve akne tipleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

B U L G U L A R

Çalışmaya alınan suşların izole elde edildiği hastaların 18'i (%28.1) erkek (yaş ortalaması 18.4±2.8), 46'sı (%71.9) kadındır (yaş ortalaması 19.6±3.4). Çalışılan 64 *P.acnes* suşunun 40'ı (%62.5) biyotip I, 3'ü (%4.7) biyotip II, 20'si (%31.3) biyotip III ve 1'i (%1.6) biyotip IV olarak tanımlanmış, biyotip V bulunamamıştır. *P.acnes* biyotiplerinin oluşturdukları klinik bulgulara göre dağılımı Tablo II'de, akne şiddeti (GAGs skoru) ile ilişkileri Tablo III'de görülmektedir. *P.acnes* biyotip I ve III ile oluşan akne lezyonlarının kliniği oldukça şiddetlidir (Tablo III).

Tablo II. *P.acnes* Biyotiplerinin Oluşturdıkları Klinik Bulgulara Göre Dağılımı

<i>P.acnes</i> biyotipi	Komedonal akne	Papülopüstüler akne	Nodülökistik akne
Biyotip I	7	20	13
Biyotip II	2	1	–
Biyotip III	4	8	8
Biyotip IV	–	1	–
Toplam	13	30	21

Tablo III. *P.acnes* Suşlarının Oluşturdıkları Akne Şiddeti

Akne Şiddeti (Ortalama GAGs skoru $\pm$ standart sapma)				
<i>P.acnes</i> biyotipi	Komedonal akne (n=13)	Papülopüstüler akne (n=30)	Nodülökistik akne (n=21)	Toplam (n=64)
Biyotip I	11.0 $\pm$ 3.6	15.2 $\pm$ 4.5	21.5 $\pm$ 5.4	16.5 $\pm$ 6.0
Biyotip II	10.5 $\pm$ 3.5	14*	–	11.7 $\pm$ 3.2
Biyotip III	9.8 $\pm$ 5.7	11.4 $\pm$ 1.5	21.8 $\pm$ 5.8	15.2 $\pm$ 7.0
Biyotip IV	–	9*	–	9*

* Az sayıda suş nedeniyle standart sapması yoktur, değer ortalamayı belirtmektedir.

Biyotiplendirilen 64 *P.acnes* izolatından 5'inde (%7.81) antibiyotik direnci saptanmış, bunların 1'i biyotip I (eritromisin dirençli), 2'si biyotip II (eritromisin ve klindamisin dirençli) ve 2'si biyotip III (eritromisin ve klindamisin dirençli) olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Dünya üzerinde çok yaygın olarak görülen ve yılda 45 milyondan fazla kişiyi etkileyen akne vulgaris, insanların yaklaşık %80'inin hayatları boyunca en az bir kez geçirilen bir deri hastalığıdır¹³. Hastalığın patogenezinine yönelik olarak uygulanan tedavi hormonal, keratolitik, sebum üretiminin azaltılması, anti-inflamatuvar ve antibakteriyel olarak gruplanmaktadır¹³. Akne vulgaris hastalarından izole edilen *P.acnes* suşlarında 1970'li yıllardan itibaren ortaya çıkan antibiyotik direnci, farklı kombinasyonlar kullanılarak azaltılmıştır^{6,14}. Ülkemizde 1998 yılında başlanan topikal eritromisin uygulaması, önce benzoil peroksit ile kombine şekilde uygulanırken günümüzde saf topikal formülasyon halinde ticari kullanıma sunulmuştur. Bu süre içinde ülkemizde iki merkezde yapılan akne vulgaris hastalarındaki taramalarda antibiyotik direnci %10'un altında bulunmuştur^{3,4}. Bu veri benzer taramaların yapıldığı ülkelerin sonuçlarından farklıdır. Bu konuda en geniş taramaları yapan Leeds Enstitüsü (İngiltere), son 30 yıl içinde direncin %50'leri geçtiğini, bugün ise kontrol programları ile direncin %20'lere indiğini belirtmektedir⁸. Benzer şekilde ABD, Avustralya, Japonya ve çeşitli Avrupa ülkeleri verileri antibiyotik direncinin

yüksek olduğunu belirtmektedirler^{8,14}. Bu ülkeler arasındaki belirgin fark, akne hastalarından izole edilen *P.acnes* biyotiplerinin toplumlar arasındaki dağılımıdır. Özellikle *P.acnes* biyotip III Uzak Doğu ülkelerinde incelenmiş ve bölgelerinde yaygın olduğu bildirilmiştir. *P.acnes* biyotip I tüm dünya üzerinde en yaygın biyotiptir^{10,15}.

P.acnes biyotipleri akne vulgarisin klinik göstergeleri ile doğrudan ilişkilidir¹⁵. Akne oluşumunu inflamasyonun nedenlerinden biri *P.acnes*'in neden olduğu nötrofil kemotaksisidir. Aynı zamanda sebace bezlerdeki trigliseridler *P.acnes*'in lipolitik enzimleri ile serbest yağ asitlerine dönüşürler. Bu serbest yağ asitleri komedonlardaki inflamasyonu artırır. En yüksek lipaz aktivitesine sahip etken *P.acnes* biyotip III'dür. *P.acnes* biyotip V'de ise lipaz aktivitesi yoktur. Bu nedenle özellikle Japonya'da anti-lipaz aktiviteye sahip tıbbi bitki özleri topikal tedavide önerilmektedir^{11,16-18}. Yüksek lipaz aktivitesine sahip olan biyotiplerin özellikle nodüler ve kistik akne lezyonlarına neden olduğu gösterilmiştir¹⁴. Bu çeşit klinik lezyonlarda *P.acnes* için etkili antibiyotik konsantrasyonlarına topikal formülasyonlar ile ulaşamaz. Yüksek penetrasyona sahip antibiyotiklerin çoğunluğu ise lipid ortamda etkisizdir. Bu hastalarda kullanılabilecek tek topikal antimikrobiyal formülasyon ülkemizde kullanımda olmayan minosiklidir^{11,19}. Bitki kökenli lipaz inhibitörlerinin (Shiunko, Jumi-haidoku-to, Kampo formülasyonları, vb) akne tedavisinde kullanımı ise henüz deneme aşamasındadır²⁰. Nodülöistik akne tedavisi için antibiyotik dışı medikasyon ve "all-trans" retinoik asittir. Bu amaçla kullanılan tretinoin, isotretinoin, adapalene, tazarotene, azelaik asid, benzoil peroksit ve salisilik asit *P.acnes*'in sayısını ve inflamasyonu azaltmaktadır⁶.

Akne vulgariste antibiyotik tedavisinin endike olduğu durumlarda topikal antibiyotikler ile tedavi monoterapi olarak 3 veya 4 haftadır. Direnç varlığında antibiyotik çinko, benzoil peroksit ve retinoidler ile kombine edilmektedir⁶. Cilt üzerinde uzun süreli Gram pozitif etkili antibakteriyel tedavi uygulanması *P.acnes* dışında antibiyotik dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkmasına yol açabilir. ABD'de akne vulgaris nedeni ile uzun süreli antibiyotik tedavisi alan hastalarda, sistemik enfeksiyon etkeni olan cilt bakterilerinin direnci sorgulanmaktadır²¹. Aynı zamanda sistemik kullanılan antibiyotikler, özellikle doksisisiklin, cilt florasında direnç gelişimine neden olabilmektedir²². Bunun bir sonucu olarak akne vulgaris tedavisinde antibiyotik olmayan ilaçlar tercih edilmeye başlanmıştır²³.

Antibiyotiklerin *P.acnes* biyotipleri üzerine etkilerini araştıran çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. *P.acnes* biyotip I, IV ve V genellikle hafif klinik tablo oluşturmaktadır. Bu nedenle bu grup hastaların 3.basamak sağlık hizmeti veren hastanelere başvurusunun daha az olacağı öngörülebilir. Sunulan çalışmada da, *P.acnes* biyotip I'in sıklıkla neden olduğu ve daha hafif seyir gösteren komedonal akne olguları az sayıda iken, tedavide zorluklarla karşılaşılan papülopüstüler ve nodülöistik akne grupları daha sık hastaneye başvurmuştur (Tablo II). Bu hasta gruplarında akne daha şiddetli seyretmiştir (Tablo III). Çalışmamızda, şiddetli akne oluşturan ve yüksek lipolitik aktiviteye sahip *P.acnes* biyotip III suşlarının sıklığı %31.3 olarak bulunmuştur. Bu oran toplum içinde şiddetli akne reaksiyonu oluşturan suşların yaygın olabileceğini de düşündürmektedir. Nodülöistik akne antimikrobiyal

dışı tedavi seçeneklerinin kullanılması, ülkemizden yapılan çalışmalarda düşük antimikrobiyal direnç oranı ile karşılaşıldığının nedeni olabilir.

Toplumumuzda *P.acnes* biyotip III'ün, dolayısıyla antibiyotik tedavisinin sorun yaratabileceği suşların sık olması, ülkemizdeki folklorik yaklaşımların incelenerek yerel topikal uygulamaların araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Bu taramaların hedefi *P.acnes*'in eliminasyonuna yönelik yeni farmasötikler olmalıdır. Sonuç olarak, ülkemizde *P.acnes* suşlarının biyotiplendirilmesinin ve antimikrobiyal direncinin araştırıldığı geniş kesitsel çalışmaların yapılması, akne hastalarına uygulanacak antibiyotik tedavisine yön verecek, gereksiz antibiyotik kullanımı ve direnç gelişimini önleyecektir kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Farrar MD, Ingham E. Acne: inflammation. Clin Dermatol 2004; 22: 380-4.
2. Smolinski KN, Yan AC. Acne update: 2004. Curr Opin Pediatr 2004; 16: 385-91.
3. Ergin Ç, Ergin Ş, Yaylı G, Baysal V. Akne lezyonlarından izole edilen *Propionibacterium acnes* suşlarında eritromisin direnci. Mikrobiyol Bult 1999; 33: 297-302.
4. Ergin Ç, Ergin Ş, Kaleli İ, Şengül M, Erdoğan BŞ. Pamukkale Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran akne vulgaris hastalarında antibiyotik dirençli *Propionibacterium acnes* varlığının araştırılması. XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 16-20 Kasım 2005, Antalya. Kongre Kitabı, P12-12.
5. Monroe S, Polk R. Antimicrobial use and bacterial resistance. Curr Opin Microbiol 2000; 3: 496-501.
6. Gollnick HPM, Krauthelm A. Topical treatment in acne: current status and future aspects. Dermatology 2003; 206: 29-36.
7. Williamson P, Kligman AM. A new method for the quantitative investigation of propionibacteria. J Invest Dermatol 1968; 45: 498-503.
8. Coates P, Vyakarnam S, Eady EA, Jones CE, Cove JH, Cunliffe J. Prevalence of antibiotic resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. Br J Dermatol 2002; 146: 840-8.
9. Marples RR, McGinley KJ. *Corynebacterium acnes* and other aerobic diptheroids from human skin. J Med Microbiol 1974; 7: 349-57.
10. Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. Appl Environ Microbiol 1979; 38: 585-9.
11. Higaki S, Nakamura M, Morohashi M, Yamagishi T. *Propionibacterium acnes* biotypes and susceptibility to minocycline and Kengai-rengyo-to. Int J Dermatol 2004; 43: 103-7.
12. Doshi A, Zaheer A, Stiller MJ. A comparison of current acne grading systems and proposal of a novel system. Int J Dermatol 1997; 36: 416-8.
13. Lee DJ, Van Dyke GS, Kim J. Update on pathogenesis and treatment of acne. Curr Opin Pediatr 2003; 15: 405-10.
14. Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, et al. Antibiotic resistant acne: lessons from Europe. Br J Dermatol 2003; 148: 467-78.
15. Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. J Dermatol 2000; 27: 519-22.
16. Higaki S, Morimatsu S, Morohashi M, Yamagishi T. The anti-lipase activity of shiunko on *Propionibacterium acnes*. Int J Antimicrob Agents 1998; 10: 251-2.

17. Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. Relationship between *Propionibacterium acnes* biotypes and Jumi-haidoku-to. J Dermatol 2000; 27: 635-8.
18. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. Ethnopharmacol 2005; 101: 330-3.
19. Akamatsu H, Nishijima S, Takahashi M, Ushijima T, Asada Y. Effects of subminimal inhibitory concentrations of erythromycin, tetracycline, clindamycin, and minocycline on the neutrophil chemotactic factor production in *Propionibacterium acnes* biotypes 1-5. J Dermatol 1991; 18: 247-51.
20. Higaki S. Lipase inhibitors for the treatment of acne. J Mol Catal B Enzym 2003; 22: 377-384.
21. Bolognia JL, Edelson RL. Spread of antibiotic-resistant bacteria from acne patients to personel contacts – A problem beyond the skin? Lancet 1997; 350: 972-3.
22. Tan HH, Goh CL. Antibiotic sensitivity of *Propionibacterium acnes* isolates studied in a skin clinic in Singapore. Arch Dermatol 1999; 135: 723.
23. Thevarajah S, Balkrishnan R, Camacho FT, Feldman SR, Fleischer AB Jr. Trends in prescription of acne medication in the US: shift from antibiotic to non-antibiotic treatment. J Dermatolog Treat 2005; 16: 224-8.