



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKNE VULGARİSLİ HASTALARDAN ÜRETİLEN
PROPİONİBACTERİUM ACNES KÖKENLERİNİN
GENOTİPLENDİRİLMESİ, GENOTİP İLE AKNE ŞİDDETİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

NİLAY ÖZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. NURVER ÜLGER

İSTANBUL-2009

I) ÖNSÖZ:

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni cesaretlendirip, çalışma azmimi arttıran, bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen tüm desteği ile her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Nurver Ülger' e,

Bizleri bilgileri ve sevgileriyle her zaman destekleyen değerli hocalarım, Prof. Dr. Güner Söyletir, Prof. Dr. Ayşegül Karahasan, Prof. Dr. Ufuk Hasdemir, Doç. Dr. Nilgün Çerikçioğlu ve Dr. Burak Aksu' ya,

Tez çalışmam boyunca tüm içtenliği ile yardımlarını benden esirgemeyen başta değerli hocam Doç. Dr. Zeynep Demirçay ve dermatoloji asistanlarına,

Eğitimim boyunca karşılıklı anlayış, uyum ve yardımlaşma içinde çalıştığımız tüm yüksek lisans ve asistan arkadaşlarıma,

Onlar olmasaydı asla olmazdı dediğim, sevgileriyle can bulup şekillendiğim, her zaman desteklerini üzerimde hissettiğim çok sevdiğim aileme,

teşekkür ederim.

II) İÇİNDEKİLER:

I) Önsöz

II) İçindekiler

III) Kısaltmalar ve Simgeler

IV) Şekil, Resim ve Tabloların Listesi

Özet

Summary

1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Epidemiyoloji	3
2.2. Etiyoloji	3
2.3 Akne Patogenezi	4
2.4 <i>Propionibacterium acnes</i>	7
3. Gereç ve Yöntem	12
3.1. Gereçler	12
3.1.1. Besiyerleri	12
3.1.2. Standart Kökenler	12
3.1.3. Kimyasal Maddeler	13
3.1.4. PZR Malzemeleri	13
3.1.5. Hazırlanan Solüsyonlar ve Besiyerleri	14
3.2. Araçlar ve Aygıtlar	16

3.3. Yöntemler	17
3.3.1. Örnek Toplama ve Nakil	17
3.3.2. Ekim ve Etken Bakteri İzolasyonu	19
3.3.3. Propionibacterium acnes' in Tanımlanması	20
3.3.4. Propionibacterium acnes' in Genotiplendirilmesi	20
3.3.5. İstatistiksel Değerlendirme	23
4. Bulgular	24
4.1. Geleneksel Yöntemlerle Bakterinin tanımlanması	25
4.2. Genotipik Test Sonuçları	26
5. Tartışma ve Sonuç	35
6. Kaynaklar	40
Ekler	
Ek1. Hasta takip formu	
Ek2. Hasta bilgilendirme formu	
Ek3 Hasta onay formu	
Özgeçmiş	
Etik Kurul Onayı	

III) KISALTMALAR VE SİMGELER:

ATCC: American Type Culture Collection

NCBL: The National Center for Biotechnology Information

P. acnes: Propionibacterium acnes

P. avium: Propionibacterium avium

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok

DNA: Deoksiribonükleik asit

GaGS: Global Acnes Grading System

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TLRs: Toll Like Receptör

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

EDTA: Ethylendiaminetetraasetic asid

TBE: Tris Boric asid Ethylendiaminetetraasetic asid

IV) ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ:

i. Resimlerin Listesi:

Resim 1: Komedonal akne

Resim 2: Papülopüstüler akne

Resim 3: Nodülokistik akne

Resim 4: *Propionibacterium acnes*’ in koyun kanlı agardaki koloni görüntüsü

Resim 5: *Propionibacterium acnes*’ in indol oluşturması

Resim 6: MMf+- MMr+ primeri ile PZR (633bç) ürünlerinin görüntüsü.

Resim 7: PAR2- PR264 primeri ile PZR (334bç) ürünlerinin görüntüsü

Resim 8: PR 219- 220 primeri ile PZR bant görüntüsü

Resim 9: PR 245- PR 247 primeri ile PZR bant görüntüsü

ii. Tabloların Listesi

Tablo 1: *Propionibacterium acnes* tarafından salgılanan ürünler

Tablo 2: Global acne grading system ile lokal skorun hesaplanması

Tablo 3: Global acne grading system ile akne şiddetinin belirlenmesi

Tablo 4: *Propionibacterium acnes*'in tanımlanmasında ve genotiplenmesinde kullanılan primerler ve PZR ürünlerinin büyüklükleri

Tablo 5: Primerler ve PZR koşulları

Tablo 6: Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı

Tablo 7: Hasta ve kontrol grubundaki yaş dağılımı

Tablo 8: İstatistiksel değerlendirme dışı örnekler ve genotipik özellikleri

Tablo 9: Lezyon tipi ile genotip arasındaki ilişki

Tablo 10: Lezyon şiddeti ile genotip arasındaki ilişki

Tablo 11: Hasta ve kontrollerden izole edilen *P. acnes* suşlarının genotip dağılımı ve eşlik eden mikroorganizmalar

Tablo 12: Lezyon tipi ile genotip arasındaki ilişki

Tablo 12: *P. acnes* ve eşlik eden mikroorganizmaların akne şiddetiyle ilişkisi

Tablo 13: Hafif ve orta şiddetteki hastalarda genotip dağılımı

Tablo 14: *Propionibacterium acnes* koloni sayısı ve akne şiddeti

ÖZET:

Derinin normal flora elemanlarından *Propionibacterium acnes*, akne vulgarisde en sık görülen mikroorganizma olup, fırsatçı sistemik veya dissemine infeksiyonlara yol açabilmektedir. *Propionibacterium acnes*'in üç genotipi (tip I [Tip IA, Tip IB], II ve III) tanımlanmış olmakla beraber, genotiplerin farklı infeksiyonlardaki rolleriyle ilgili epidemiyolojik çalışmalar çok azdır ve fazla bildirim olmamıştır. Bu çalışmada *P.acnes* genotipleri ile akne şiddeti arasında bir bağlantının olup olmadığı araştırılmıştır. Marmara Üniversitesi Hastanesi, Dermatoloji bölümüne başvuran 58 hasta (35 kadın, 21 erkek) ve kontrol grubu olarak 43 sağlıklı kişi (27 kadın, 12 erkek) çalışmaya alınmıştır. Yüzdeki, komedon, papül, püstül, nodül ve eritem lezyonlarının sayısı kayıt edilmiş ve “Global Acne Grading System” (GAGs)’e göre derecelendirilmiştir. Akne lezyonlarından ve kontrol grubunun yüzünden alınan örneklerin aerop ve anaerop koşullarda kültürleri yapılmıştır. Hastaların tümünde ve kontrol grubundan *P. acnes* izole edilmiş ve geleneksel yöntemlerle tanımlanmış ve özgün primerler kullanılarak PZR yöntemiyle genotipik analizleri yapılmıştır. Kökenlerin 77’si (n:47 hasta, n:30 kontrol) genotip IA PZR bantları vermiştir, bunları tip IB (n:5 hasta, n:5kontrol) ve Tip II (n:4 hasta, n:4 kontrol) izlemiştir. Tip III *P.acnes* saptanmamıştır. Genotipler ile akne lezyonlarının şiddet skorları arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bulgular, *P.acnes* genotipleri ile akne şiddeti arasında herhangi bir bağlantı göstermese de bu çalışma, şimdiye kadar moleküler araştırmalarla *P.acnes*’in genotiplemesinin yapılmadığı Türkiye için bir veri tabanı oluşturacaktır. Verilerimiz, bu farklı *P.acnes* genotiplerinin fenotipik özelliklerini incelemek ve akne şiddetiyle ilişkisini araştırmak için ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Sözcükler: Akne vulgaris, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes* genotipleri

SUMMARY:

Genotyping of *Propionibacterium acnes* strains isolated from patients with acne vulgaris and investigation of relationship between genotype and acne severity

Propionibacterium acnes, a member of skin flora, is the most commonly encountered microorganism in acne vulgaris, and can be found in various systemic or disseminated opportunistic infections. Although three genotypes of *Propionibacterium acnes* (types I [Type IA and Type IB], II and III) have been described, there are few epidemiological investigations of their roles in different infections and have not been widely reported. Current study focuses on the relationship between the genotype of *Propionibacterium acnes* and the severity of acne vulgaris. Fifty-eight patients (35 females and 21 males) who admitted to Marmara University Hospital, Department of Dermatology and 43 healthy people (27 females and 12 males) as controls were enrolled in the study. The number of lesions of facial acne, defined as comedones, papules, pustules, nodules and erythema, was recorded and scored according to Global Acne Grading System (GAGs). The samples obtained from the acne lesions and from facial skin of control group were cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Propionibacterium acnes* was isolated from all patients and control group and identified by conventional methods, and genotypic analysis was made by PCR using specific primers to genotypes. A total of 77 isolates (n:47 patient, n:30 control) showed genotype IA PCR bands, followed by type IB (n:5 patient, n:5 control) and type II (n:4 patient, n:4 control). No type III *P.acnes* has been detected. No significant correlation existed between the genotype of *P.acnes* and severity score of acne lesions. Although the findings did not link *P. acnes* genotype to severity of acnes, the present study did form a database about genotypes of *P.acnes* in Turkey, where molecular investigation of *P.acnes* genotypes has not been performed so far. Our data will be enlighten for future studies to examine phenotypic properties of these different genotypic *P. acnes* and investigate the relationship between acne severity.

Key Words: Acne vulgaris, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes* genotypes

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Piloseböz foliküllerinin inflamatuvar bir hastalığı olan akne vulgaris, özellikle gençler ve genç erişkinler arasında sık görülen, en fazla yüz, boyun ve gövdenin üst kısmını tutan dermatolojik bir problemdir. Kişinin dış görünüşünü etkileyebilen ve skar bırakabilen akne, depresyon, kaygı ve sosyal inhibisyon gibi psikolojik sorunlara da neden olabilmektedir.

Multifaktöriyel bir hastalık olan aknenin etiyolojisinde, anormal foliküler keratinizasyon, hormonal etkilere bağlı sebum sekresyonunda artış, mikrobiyal kolonizasyon ve inflamasyon yer almaktadır. Akne vulgaris oluşumunda önemli bir role sahip mikroorganizmalardan *Propionibacterium acnes*; derinin normal florasında bulunmaktadır. Ancak bu bakteri, yapay kalp kapağı, damar grefti, merkezi sinir sistemi şantı ve protezi olan hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmekte, endokardit, endoftalmit, oküler, perioküler, dental, periodontal enfeksiyonlara, ve osteomyelitte yol açabilmektedir. Ayrıca son yıllarda sarkoidoz ve prostat kanseri gelişiminde de etkisinin olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir.

Puberte ile birlikte androjenlerin artışıyla sebum üretimi artmakta ve aknenin öncü lezyonu olan komedonlar oluşmaktadır. Diğer yandan foliküler floranın baskın elemanı olan *P. acnes* tarafından salgılanan enzimlerin gerek doğrudan zedelenme etkisiyle, gerekse bunlara karşı gelişen konağın aşırı duyarlılık yanıtıyla aknenin inflamatuvar lezyonları ortaya çıkmaktadır. Bu lezyonlar klinikte papül, püstül, nodül ve kist şeklinde görülmektedir. Ayrıca hastaların akne lezyonları, ağırlıklı lezyon tipine göre komedonal, papülopüstüler ve nodülökistik olarak ayrılmaktadır.

Serolojik aglütinasyon testleri ve hücre duvarı karbohidratlarının analiziyle *P.acnes*'in iki farklı fenotipi (tip I ve tip II) tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bu iki tipin şekerleri fermente etme özelliklerinin ve bakteriofajlara duyarlılıklarının da farklı olduğu gösterilmiştir. Genetik çalışmalarda ise farklı tipte bakterilerin 16s rRNA gen dizi analizinde %100'lük benzerlik saptanmış, buna karşın bakteri tiplerinin farklı *recA* gen dizisine sahip oldukları ve farklı filogenetik yerleşim gösterdikleri belirlenmiştir. Bu özellikleri göz önüne alınarak *P.acnes* kökenleri *recA* geni dizi farklılığına göre tiplendirilmiştir, şimdiye kadar üç genotip (Tip I [TipIA, TipIB], TipII, TipIII) tanımlanmıştır.

Fenotipik çalışmalarda yüksek virülans özelliğine sahip biyotiplerin daha fazla oranda papül, püstül ve nodül gibi şiddetli klinik tablolara yol açtıkları bildirilmiştir. Birtakım virülans faktörleri ile biyotipler arasındaki bağlantının araştırıldığı çalışmalar yapılmış olmakla beraber, bakterinin genotipi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır ve aknenin, lezyon tipi veya şiddeti gibi farklı klinik şekilleriyle ile genotipler arasında ilişkinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Hastanesi, Dermatoloji kliniğine başvuran akne vulgarisli hastaların farklı özelliklere sahip lezyonlarından izole edilen *P. acnes* kökenlerinin genotiplerini tanımlamak, genotipin farklı şiddetli lezyonlardaki dağılımını belirlemek ve lezyonun şiddeti (ve lezyon tipi) ile genotip arasındaki ilişkinin varlığını araştırmak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Akne vulgaris, pilosebace ünitelerinin multifaktörel bir hastalığıdır. Kliniği hafif komedonal formdan ağır lezyonlara kadar değişkenlik gösterir. Her yaştaki kişiyi etkilemekle beraber primer olarak adolesan dönemde görülmektedir. Dermatolojik bir problem olmasının yanı sıra psikolojik ve sosyal açıdan ciddi etkiler yaratabilmektedir (1,2).

2.1. Epidemiyolojisi

Akne vulgaris, 12–24 yaşları arasında görülen pilosebace foliküllerinin kronik inflamatuvar bir hastalığıdır, çoğunlukla 25 yaşından önce kendiliğinden düzelir, ancak olguların %5'inde, özellikle kadınlarda 30'lu-40'lı yaşlara kadar sürebilir. Her iki cinsde eşit sıklıkla görülmekle beraber erkeklerde daha ağır seyretmektedir (3,4). Aknelerin çoğu pleomorfik olup; komedon, papül, püstül, kist, nodül lezyonları şeklinde bulunabilir, çukurlar veya hipertrofik skarlar gelişebilir. Özellikle yüz, boyun ve üst gövdeyi tutmaktadır (5).

2. 2. Etiyolojisi

Akne vulgarisin etiyolojisinde dört ana faktör yer almaktadır;

- 1- Anormal foliküler keratinizasyon
- 2- Sebum sekresyonunda artış
- 3- Mikrobiyal, özellikle *P. acnes* kolonizasyonu
- 4- İnflamasyon

Bunun yanı sıra genetik faktörler de önemli rol oynamaktadır. Israrcı ve şiddetli akneleri olan hastaların soy geçmişleri sorgulandığında, yakın akrabalarında da benzer şekilde şiddetli aknenin bulunduğu görülmüştür. Bu kişilerde akne vulgaris erken yaşlarda ortaya çıkmakta ve tedaviye daha fazla direnç göstermektedir (6). Diğer yandan XYY genotipine sahip kişilerde daha ağır nodülökistik akne vulgaris gelişebilmektedir (7).

2.3.Akne Patogenezi

Piloseböz ünite, bir kıl folikülü ve ona açılan sebace bezden oluşmaktadır. Bu yapı çok katlı yassı epitel ile döşeli infundibulum denen bölge ile deri yüzeyine açılır. Seböz bezler salgılanan hormonlarla kontrol edilmektedir. Ergenliğe geçişle birlikte artan hormonların etkisiyle piloseböz üniteye değişiklikler; foliküler keratinizasyon ve sebum sekresyonunda artış gözlenmektedir (8,9).

Akne gelişiminde ilk adımı oluşturan mikrokomedonlar, infundibulum proksimalinin üst tabakasının keratinizasyonu ile başlamakta, daha sonra açık ve kapalı komedon halini almaktadır. Tanımlamak gerekirse komedonlar (tıkaçlar); normalde folikül lümenine dökülen korneositlerin folikül ağzında birikmesiyle oluşturdıkları hiperkerositlerdir. Yapışkan bir özelliğe sahip olan bu yapıda aynı zamanda keratinozomlar, hücre zarları, epiderm lipidleri ve intraselüler sementinler de bulunmaktadır. İfundibulum distalinde herhangi bir madde birikmesi söz konusu olmayıp, proksimaldeki komedon ise gittikçe büyümektedir. Komedonun büyümesiyle komedon duvarında gerilme, folikül kanalında yırtılma oluşmakta, immunojenik özelliğe sahip keratojenik ve seboreik içerik ortama saçılmaktadır (1,10).

Folikül içeriğinin dermise geçmesi, var olan inflamasyonu arttırmakta, yabancı cisim yanıtı oluşturmakta ve kliniğe farklı şiddette akne şeklinde yansımaktadır (Resim 1,2,3). İnflamasyonun ilk belirtileri foliküler eritemli papüller şeklinde gözlenmektedir. Daha sonra püstüler yapılar ortaya çıkmakta, yağ bezlerinin çok irileştiği ve nodül halini aldığı kistik akne tipleri oluşmaktadır (8).



Resim 1 Komedonal akne



Resim 2 Papülopüstüler akne



Resim 3 Nodülökistik akne

Komedon oluşumunda linoleik asit eksikliğinin önemli olduğu saptanmıştır. Sebumdaki linoleik asit eksikliği epitel farklılaşmasını engellemekte ve hiperkeratinizasyona yol açmaktadır (11). Başka bir çalışmada ise sitokinlerden IL-1 α 'nın infundibulumdaki keratinositlerden hiperkornifikasyon yaptığı tespit edilmiştir. (12).

Akne oluşumunda rol alan faktörlerin bir diğeri de androjenlerdir. Genellikle ergenlik dönemiyle birlikte artan androjen seviyesi sebum sekresyonuna, dolayısı ile akne oluşumuna yol açmaktadır (13) Androjen miktarından ziyade, reseptörlerin aknenin oluşumunda önemli olduğu görülmüştür (14).

Sebasöz folikülün normal florasında patojen olmayan bakteriler, lipofilik mayalar ve kıl folikül akarı (mite-*Demodex folliculorum*) bulunmaktadır. Sebum üretimindeki artış, derinin normal flora elemanlarından *P. acnes*' in çoğalabilmesi için gerekli ortamı oluşturmaktadır (15).

Propionibacterium acnes yüz, göğüs ve sırtta, sebumdan zengin foliküllerde kolonize olmaktadır. Foliküle yerleşen *P.acnes* ürettiği lipaz enzimi ile trigliseridleri serbest yağ asitlerine hidrolize etmektedir. Ardından aknenin öncü molekülü komedon oluşmakta ve inflamasyon gelişmektedir. Aynı zamanda *P. acnes*' in salgıladığı kemotaktik sitokinler ile kompleman sistemi aktive olmakta ve nötrofillerin komedonun olduğu bölgeye doğru çekilmesi sağlanmaktadır (16, 17).

2.4. *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes, gram pozitif, sporsuz, katalaz enzimine sahip, indol oluşturabilen, difteroid görünümde anaerop bir basildir. Anaerop ortam koşullarında 35- 37°C’ de 5-7 günlük inkübasyon sonucunda izole edilmektedirler.  remeleri için optimal pH 5.5- 6.0 arasındadır (18).

Koloni morfolojileri farklı besiyerlerinde ve kültür koşullarıyla değişmekle birlikte, koyun kanlı besiyerinde 1-2 mm çapında yuvarlak, keskin sınırlı, konveks, opak koloniler oluşmakta, bazı suşlar koloni etrafında hemoliz zonu oluşturabilmektedir. Mikroskop altında 0.5- 0.8 m eninde ve yaklaşık 4  m boyunda difteroid basiller şeklinde görülmektedir (19).

Gram pozitif hücre duvarı sayesinde osmotik çok ve mekanik strese karşı direnç sağlamaktadırlar. Serbest yağ asitleri ile gliserolu, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Glikoz metabolizmasının son ürünü olarak propionik asit ve asetik asit üretmeleri onları diğer gram pozitif basillerden ayırmada yardımcı olmaktadır (20).  remeleri için biyotin, nikotinamid, pantotenat, tiamin gibi vitaminlere ihtiyaçları vardır (21).

Derinin normal flora elemanı olan *P.acnes*, oral kavite, üst solunum yolu, dış kulak yolu, konjunktiva, kalın barsak, üretra ve vajinadan da izole edilmektedir (22). Yapay kalp kapağı, damar grefti, merkezi sinir sistemi şantı ve protezi olan hastalarda fırsat  enfeksiyonlara neden olmakta ayrıca endokardit, endoftalmit ve osteomiyelit yapabilmektedir (23).

Propionibacterium acnes akne vulgaris oluşumunda önemli role sahiptir. Salgıladıkları lipaz enzimi ile sebasöz bezlerdeki trigliseridleri serbest yağ asitlerine dönüştürmektedirler. Bu yan ürünler ile folikül duvarını irite ederek inflamasyonu tetiklemektedirler. Böylelikle nötrofil kemotaksisine neden olmaktadır (8).

Yapılan çalışmalarda *P. acnes* infeksiyonlarında Toll-like receptor'lerin (TLRs) önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. *Propionibacterium acnes*'in keratinositlerdeki TLR2 ve TLR4' ekspresyonunu indüklediği ve bu reseptörlere bağımlı çözünür kemotaktik maddelerin salgılanmasını arttırdığı tespit edilmiştir. Bu bakterinin, IL-8, tumor nekrozis faktör- α , IL1 β ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinlerin ve birtakım antimikrobiyal peptidlerin üretimini de teşvik ettiği anlaşılmıştır (18,24).

Propionibacterium acnes kökenlerinin biyofilm oluşturabildikleri böylece konak immun sistemine ve kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri saptanmıştır (25). Diğer yandan fagositoza direnç gösterebilmekte, makrofajların içinde uzun süre canlı kalabilmekte ve immun reaksiyonları tetiklemektedirler. Ayrıca *in vivo* koşullarda düşük oksidasyon redüksiyon potansiyelinde uzun zaman aralığında canlılıklarını koruyabilmektedirler. Bu durumda insan dokularında uzun süre bulunarak metabolik ürünleriyle (asetat, propionat, indol, porfirin) dokulara zarar verebilmektedirler (26). *Propionibacterium acnes* tarafından salgılanan ürünler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 *Propionibacterium acnes* tarafından salgılanan ürünler *

Ürün	Substrat	Etkisi
Lipaz	Trigiliseritler	Besin, serbest yağ asidi üretimi, adherens
Fosfolipaz C	Fosfolipidler	Zar fonksiyonunu bozmak
Proteinaz	Kollajen, keratin	Besin, Kompleman aktivasyonu, kemotaksis, doku invazyonu
Hiyaluronidaz, nörominidaz	Mukopolisakkaritler	Doku invazyonu
Asit fosfotaz	Şeker fosfotaz	Besin
Bakteriyosin		Antagonistik etki

* 18 no'lu kaynaktan alınmıştır

Serolojik aglütinasyon testleriyle ve hücre duvarı şekerlerinin analiziyle fenotipik olarak iki tip *P.acnes* (Tip I ve Tip II) tanımlanmıştır (27). İki biyotipin şekerleri fermente etmede ve şekerlerden alkol oluşturmada farklı özelliklere sahip olduğu ve bakteriyofaj infeksiyonuna duyarlılıklarının da farklı olduğu gösterilmiştir (28). Daha sonraki çalışmalarda *P. acnes* izolatları karbohidrat fermantasyon testleri (riboz, eritrol ve sorbitol), serolojik aglütinasyon testleri ve hücre duvarındaki şeker cinsleri esas alınarak 5 biyotip içinde sınıflandırılmıştır. Örneğin bu sınıflandırmaya göre Tip I kökenleri hücre duvar şekerleri olarak galaktozu, Tip II kökenleri ise glukoz ve mannozu bulundurmaktadır. Sağlıklı kişilerdeki yaygın görülen serobiyotipler IB1, IB3, IB4 ve IIB2' dir (29).

Akne vulgaris dışında sistemik infeksiyonlara da yol açabilen *P.acnes*'e son yıllarda daha fazla önem verilmeye başlanmış, *P. acnes* kökenleriyle yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Daha çok genotipler ve antibiyotik direnci üzerine moleküler çalışmalar yapılmıştır. *Propionibacterium acnes*'in DNA dizisinin tamamı Bruggemann ve arkadaşları (30) tarafından tanımlanmıştır. Bakteri DNA'sının toplam 2333 gen bölgesine sahip olduğu, genler tarafından kodlanan ürünlerin çoğunu; sialidazlar, nörominidazlar, endoglikoseramidazlar ve lipaz gibi faktörlerin oluşturduğu saptanmıştır. Üretilen bu faktörlerin ve hücre duvar yüzeyinde bulunan proteinlerin akne oluşumuna neden olan inflamasyonu tetiklediği belirtilmiştir.

Bakteri DNA dizisi tanımlandıktan sonra serotiplere göre ayrılmış kökenlerin 16S rRNA bölgesinin dizi analizi yapıldığında kökenler arasında tam bir homoloji saptanmıştır. Ancak, onarımla ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen RecA proteini kodlayan *recA* geninin dizi analizi yapıldığında, iki tipin tamamen farklı iki filogenetik grupta yer aldıkları gözlenmiştir. Ayrıca moleküler çalışmalarda Tip I de yer alan kökenlerin de iki farklı grup özellikleri gösterdikleri (Tip IA ve TipIB) saptanmıştır (31) .

Tip I ve II'den yüzey özellikleri bakımından ve hücre duvar yapısından farklılık sergileyen bir başka genotip Tip III tanımlanmıştır (32). Aynı araştırmacıların yaptıkları ileri çalışmalarda *P.acnes* Tip III kökenlerinin farklı *recA* gen dizisine sahip oldukları gösterilmiştir.

Cohen ve arkadaşları tarafından, 34 hastadan prostat dokusu kültürleri yapılmış, bakteriyel etkenler yönünden incelenmiştir. Şiddetli prostat inflamasyonu olan hastalarda inflamasyon olmayanlara göre daha yüksek oranda *P. acnes* pozitifliği saptanmıştır ($p=0.007$) İzole edilen *P.acnes* kökenlerinin, deriden izole edilen kontrol grubundaki *P. acnes* –grup I’dekinden farklı olarak grup II ve III’te yer aldığı bulunmuştur.

Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar, *P.acnes* kökenlerinin (özellikle belirli tip-Grup II ve Grup III) prostatta inflamasyon oluşturabileceği, inflamasyonun da prostat kanseriyle ilişkisi olabileceği yönünde varsayımda bulunmuşlardır (33).

Propionibacterium acnes tipleri ile ortopedik implantı olan kişiler arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, ortopedik implantı olan hastalarda *P. acnes*’ in sıklıkla gözlendiği belirtilmiştir. Enfeksiyon olsun ya da olmasın Tip I ‘in bulunma sıklığı Tip II’ den fazla bulunmuş, Tip III çalışmada saptanmamıştır. Ortopedik implantı olan hastalarda Tip I ve Tip II arasında enfeksiyon ya da kolonizasyonla ilişkili bir durum saptanmamıştır (34).

Literatür taramasında farklı genotiplere sahip *P.acnes* kökenleri ile akne lezyon tipi veya akne şiddeti arasında ilişkinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1 Besiyerleri

- % 5 koyun kanlı Columbia agar (Biomérieux)
- Çukolata agar (Biomerioux)
- Mueller Hinton broth (Becton Dickinson)
- Skim milk (Oxoid)

3.1.2 Standart Kökenler

- ATCC 11828 *Propionibacterium acnes* serotip II
- ATCC 11827 *Propionibacterium acnes* serotip I A
- *P.acnes* 6609 *Propionibacterium acnes* serotip I B

ATCC 11828 *Propionibacterium acnes* serotip II ve *P. acnes* 6609 *Propionibacterium acnes* serotip IB, Prof.Dr. Elizabeth Nagy'den (Szeged Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji Enstitüsü, Szeged, Macaristan)

ATCC 11827 *Propionibacterium acnes* serotip I A, Doç. Dr. Hırısı Bahar' dan (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul) temin edilmiştir.

3.1.3 Kimyasal Maddeler

- Paradimethylaminocinnamaldehyde (Aldrich)
- Hidrojen peroksit (Merkez laboratuvarı)
- Anaerogen (Biomerieux)
- Etil alkol (Riedel- de Haen)
- NaCl (Merck)
- KCl (Horasan Kimya)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- % 37 HCl (Carlo Erba)

3.1.4 PZR Malzemeleri

- PCR Master Miks (2X) (Fermentas)
- 6 x Yükleme boyası (Loading Dye, MBI Fermentas)
- MMf- MMr, PR264- PAR2, PR219-220, PR256- 257, PR245- 247, 16SIF-16SIR primer çiftleri (IDT)
- 100 kb DNA Ladder (MBI Fermentas)
- Enjeksiyonluk su (DNaz- RNaz içermeyen distile su) (MBI Fermentas)
- 10x TBE Tampon (Tris, EDTA, Borik asit)
- 1,5 ml, 0,5 ml ve 0,2 ml lik mikrotüpler (Axygen)
- 200 µl sarı, 1000 µl mavi pipet ucu (DNaz, RNaz içermeyen) (Axygen)
- Agaroz (Applchem)
- Etidyum bromid (Merck)
- Eldiven (Beybi)

3.1.5 Hazırlanan Solüsyonlar ve Besiyerleri

Taşıma solüsyonunun hazırlanışı

Toplama ve taşıma solüsyonu olarak % 0.1 tween 80 içeren 0. 075 M fosfatlanmış fizyolojik tuzlu su kullanılmıştır.

NaCl..... 4 gram
KCl 0. 1 gram
Na₂HPO₄ 0. 575 gram
KH₂ PO₄..... 0.2 gram
Distile su 500 ml
% 0.1 tween 80 1 ml

Tüm malzemeler karıştırılarak pH metre ile pH 7.2' ye ayarlandıktan sonra 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiş, steril cam tüpler içerisine 500'er µl dağıtılarak hazırlanmıştır.

İndol ayırıcının hazırlanması

Paradimethylaminocinnamaldehyde..... 0.1 gram
% 37 HCl..... 1 ml

0.1 gram paradimethylaminocinnamaldehyde 1 ml % 37' lik HCl asit içerisinde çözdürülmüş, üzerine 9 ml distile su yavaşça eklenerek karıştırılmış, ılık almayacak şekilde + 4°C'de saklanmıştır.

TBE Tampon (10X, Stok Solüsyon)

Tris Base..... 121, 10 gram

Borik Asit..... 61, 83 gram

EDTA..... 5, 84 gram

Distile su.....1000 ml

Sodyum hidroksit ile pH 8' e ayarlanmıştır.

% 70' lik Etil alkol hazırlanışı

70 ml absolu alkol alınıp üzerine 30 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır.

% 0. 09' luk NaCl hazırlanışı

9 gram NaCl 1 litre distile suda çözdürülmüş, 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Mueller Hinton sıvı besiyerinin hazırlanışı

22 gram toz besiyeri tartılıp 1 lt distile su ile karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Skim Milk

100 gram toz, 1 lt distile su ile karıştırılıp, 121 ° C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır.

3.2 Araçlar ve Aygıtlar:

- Etüv (Memert)
- Pasteur fırını (Memert)
- Otoklav (Hirayama)
- Buzdolabı (Arçelik)
- (- 20 °C) Dondurucu (Uğur)
- (- 80 °C) Dondurucu (iShin)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Kaba terazi (Scaltec)
- Vorteks (Yellowline, Ika)
- Steril eküvyonlar
- Termal Döngü Cihazı (Techne, BIO-RAD)
- Elektroforez tankları ve cihazı (Biometra)
- pH metre cihazı (Hana Instruments)
- Mikrodalga fırın (Beko)
- UV görüntüleyici (Vilber Lourmant)
- Santrifüjler (Hettich)
- Etüv (Binder)
- Işık Mikroskobu (Olympus)
- Otoklav (Hirayama)
- Cam balonlar, otomatik pipetler, lamlar

3.3 Yöntemler

3.3.1 Örnek Toplama ve Nakil

Çalışmamıza, Ocak 2009- Haziran 2009 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Dermatoloji Kliniğine başvuran, son 4 hafta öncesine kadar sistemik antibiyotik veya isotretinoin ile topikal herhangi bir akne ilacı almamış ve son 3 ay öncesine kadar sistemik kortizon veya immünsüpresif bir ilaç kullanmamış, 15 ile 35 yaş arasındaki akneli hastalar dahil edilmiştir.

Global acne grading system'e (GAGs) göre belirlenen hafif, orta ve şiddetli akne lezyonlarından ve kontrol grubu olarak sağlıklı kişilerin derilerinden örnekler alınmıştır (35). Ayrıca hastaların akne lezyonları ağırlıklı lezyon tipine göre; komedonal, papülopüstüler ve nodülökistik olmak üzere değerlendirilmiştir.

Akne şiddetini belirlemek için GAGs'e göre yüz bölgesi; alın, sağ yanak, sol yanak, burun ve çene olmak üzere beş kısım, göğüs ve sırt beraberce bir kısım olmak üzere toplam altı bölge oluşturulmuştur (35). Her bir bölgenin sabit çarpanı (çarpım faktörü belirlenmiş) bulunmaktadır, örneğin sabit çarpan alın için 2, çene için 1 ve göğüs ve sırt için 3 dir. Diğer yandan her bir lezyonun şiddetine göre sıfır ile 4 arasında değişen; örneğin lezyon yok ise 0, nodül varsa 4 puan verilmektedir (Tablo 2). Aynı ayrı altı bölgenin lezyonları değerlendirilmekte lezyon şiddeti en fazla olan akne tipi skorlamada kullanılmaktadır. Örneğin sağ yanakta komedon, papül ve püstül varsa, bu lezyonlar arasında en yüksek puana sahip püstülün değeri (=3) alınmakta, sağ yanağın sabit çarpanı (=2) ile çarpılarak lokal skor hesaplanmaktadır ($3 \times 2 = 6$). Lokal skorların toplamı global skoru vermektedir. Global skor değerlerine göre lezyonlar hafif (1-18), orta (19-30), şiddetli (31-38) veya çok şiddetli (>39) olarak değerlendirilmektedir (Tablo 3) .

Çalışmamızda, hastaların burun dışındaki bölgelerinde bulunan akne lezyonları değerlendirilmiştir. Her bölge için lokal skor oluşturulmuş daha sonra lokal skorlar toplanarak global skor, lezyon şiddeti belirlenmiştir.

Tablo 2 Global Acne Grading system ile lokal skorun hesaplanması

Yer	Faktör x Derece (0- 4)*
Alın	2 x derece
Sağ yanak	2 x derece
Sol yanak	2 x derece
Burun	1 x derece
Çene	1 x derece
Göğüs- Sırt	3 x derece
Lokal skor	

* Lezyon yok: 0, Komedon: 1, Papül:2, Püstül: 3, Nodül: 4

Tablo 3 Global Acne Grading system ile akne şiddetinin belirlenmesi

Global skor	Akne şiddeti
0	Yok
1- 18	Hafif
19- 30	Orta
31- 38	Şiddetli
> 39	Çok şiddetli

Hastalar bilgilendirildikten ve onayları alındıktan sonra akne lezyonlarının çeşidine göre, kültür için sürüntü veya lezyon içeriği alınmıştır. Önce lezyon yüzeyi % 70' lik etil alkol ile silinmiş, papül yüzeyinden serum fizyolojik ile ıslatılmış pamuklu çubuk ile sürüntü, diğer lezyonlardan komedon, püstül ya da nodülden ise içerikleri alınarak anaerop taşıma besiyeri (% 0.1 tween 80 içeren 0. 075 M fosfat tamponlu fizyolojik tuzlu su) içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Kontrol grubu gönüllülerin alın bölgesinde, benzer şekilde steril tuzlu su ile ıslatılmış pamuklu çubuk ile deri sürüntüsü alınmıştır (36).

3.3.2 Ekim ve Etken Bakteri İzolasyonu

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan örnekler laboratuvar ortamına ulaştırıldığında taşıma tüplerinin içine 500 µl Mueller Hinton sıvı besiyeri ekleyerek toplam hacim 1 mililitreye tamamlanmış, ardından vorteksleyerek süspansiyon elde edilmiştir. Steril pamuklu çubuklar tüpün kenarında iyice süzöldükten sonra çıkarılmıştır. Bu süspansiyondan 100 µl , başka bir steril cam tüp içerisinde bulunan 900 µl serum fizyolojik içine eklenmiş ve vortekslenmiştir. Ana karışım ve 1/10 kez sulandırılmış karışımlardan 100'er µl alınarak % 5 koyun kanlı agar sayım plağı yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Plaklar anaerop koşullarda 37° C de 7 gün inkübe edilmişlerdir (36).

3.3.3 *Propionibacterium acnes*' in tanımlanması

İnkübasyon sonrası üremeli petrilerdeki tüm farklı koloniler sayılmış ve anaerop olup olmadıklarını belirlemek amacıyla aerotolerans testi yapılmıştır. Her farklı koloniden iğne öze ile % 5'lik koyun kanlı ve çukulata besiyerine ekim yapılmıştır. Koyun kanlı besiyeri anaerop ortama kaldırılırken, çukulata besiyeri karbondioksitli ortamda 37° C'de inkübe edilmiştir. Sadece anaerop ortamda üreme gösteren koloniler değerlendirmeye alınmıştır. Kolonilerden preparat hazırlanarak Gram yöntemiyle boyanmıştır. Bakterilerin katalaz ve indol oluşturup oluşturmadıkları araştırılmıştır (20).

Direkt bakıda, gram pozitif ya da gram değişken boyanmış difteroid benzeri kok ve kokoid basiller şeklinde görülen, katalaz enzimi olan, indol oluşturabilen bakteriler stok besiyeri skim milk' e alınmış ve daha sonra çalışılmak üzere - 80° C de saklanmıştır.

3.3.4 *Propionibacterium acnes*' in Genotiplendirilmesi

3.3.4.1 DNA İzolasyonu

Stoktan çözülen kökenlerin ikinci pasajları yapıldıktan sonra kaynatma yöntemiyle DNA' ları elde edilmiştir. Küçük ependorflar içinde, 200 µl DNaz, RNaz içermeyen distile suda bakteriden alınan 5- 6 koloni süspanse edilmiş, daha sonra 95° C' de 20 dakika ısıtılarak 2 dakika en yüksek devirde santrifüjlenmiştir (31).

3.3.4.2 PZR yöntemi

Öncelikle elde edilen bakteri DNA' ları ile uygun primerler (Tablo 4) kullanılarak *Propionibacterium*' a özgü tanımlayıcı gen ile bakterinin *recA* geni amplifiye edilmiştir (37). Her iki geni pozitif olanların diğer genotipik özellikleri araştırılmak üzere işleme alınmıştır.

Bunun için;

PZR karışımı.....	25 µl
Primer Forward.....	1 µl
Primer Reverse.....	1 µl
H ₂ O.....	21 µl

karıştırılmış ve üzerine 2 µl bakteri DNA' sı eklenerek termal döngü cihazında çalışılmıştır.

Tablo 4 *Propionibacterium acnes*'in tanımlanmasında ve genotiplemesinde kullanılan primerler ve PZR ürünlerinin büyüklükleri *

Primerin adı	Primer dizisi (5'- 3')		Ürün baz çifti (bp)
MMf+ (F)	GGAATATTGAACGAGTCGCAGA	<i>P. acnes</i>	633
MMr+ (R)	CGGGTACGGCAAGATGTTCT	<i>P. avium</i>	633
PR264 (F)	GCAGGCAGAGTTTGACATCC	<i>P.acnes recA</i>	334
PAR-2 (R)	GCTTCCTCATACCACTGGTCATC		
PR 219	ACGACCGGTTTGTTGTGAG	<i>P.acnes</i> Tip IA,	508
PR 220	GGGTCAACCTTGACAACCAC	Tip IB	716
PR 245	ATAAACCCATCGGCGGCTCGAT	<i>P.acnes</i> Tip IA, Tip II	4027
PR 247	AGCAAGGGAGCATTCACTGG	Tip IB	573
16SIF+	TGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Tüm bakteriler için 16S rRNA	801
16SIR+	GGACTACCAGGGTATCTAAKCCTG		

* 37 no' lu kaynaktan alınmıştır.

Oluşan PZR ürünleri % 1' lik agaroz jelde 90 volt akımda yürütülmüş, gözlenen bantlar kontrol köken bantlarıyla kıyaslanmıştır. Kontrol kökenlerinkinden farklı büyüklükte bant oluşturan kökenlerin *recA* geni dizi analizine gönderilerek NCBL Blast programında genotiplerin dizileriyle kıyaslanmıştır.

Tablo 5 Primerler ve PZR koşulları *

Primer	Döngü koşulları
MMf+ - MMr+	95 °C 15 dk 1 döngü
PR264 – PAR-2	94 °C 30 sn } 35 döngü
PR219 – PR220	55 °C 30 sn }
	72 °C 1dk }
PR245 – PR247	95 °C 15 dk 1 döngü
	94 °C 30 sn } 35 döngü
	65 °C 30 sn }
	72 °C 1dk }

* 37 no' lu kaynaktan alınmıştır.

3.3.5 İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma veri analizinde Microstat ve Instat istatistiksel yazılım programları kullanılmıştır. Akne şiddeti ve genotip arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Pearson'ın ki- kare ve Kolmogorov Smirnov iki örnekli testleri kullanılmış, $p < 0.005$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Ocak 2009- Haziran 2009 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dermatoloji polikliniğine başvuran 58 akne hastasından ve 43 kişilik kontrol grubundan alınan örnekler değerlendirilmiştir. Değerlendirmeye alınan hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6 Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	Hasta (n %)	Kontrol (n %)	Toplam (n %)
Kadın	36 (62)	31 (72)	67 (66)
Erkek	22 (38)	12 (28)	34 (34)
Toplam	58 (100)	43 (100)	101 (100)

Hasta ve kontrol grubu 15-35 yaş aralığındaki kişilerden oluşturulmuştur, yaş dağılımı Tablo 7’deki gibidir.

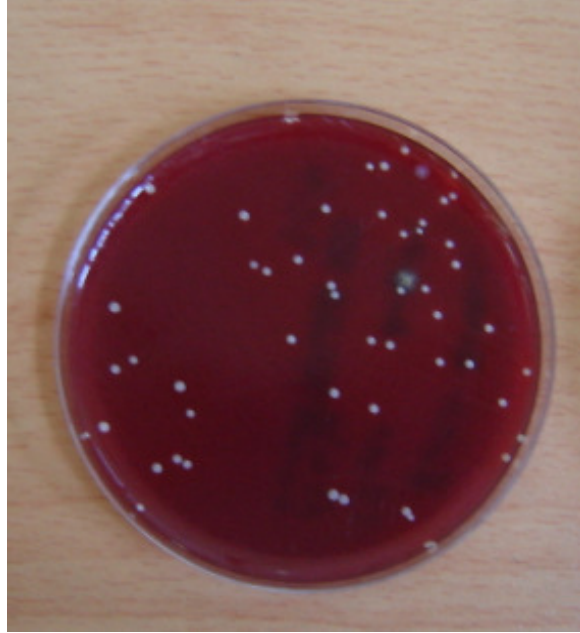
Tablo 7 Hasta ve kontrol grubundaki yaş dağılımı

Yaş aralığı	Hasta (n %)	Kontrol (n %)	Toplam (n %)
15- 24	51 (88)	37 (86)	88 (87)
> 25	7 (12)	6 (14)	13 (13)
Toplam	58 (100)	43 (100)	101 (100)

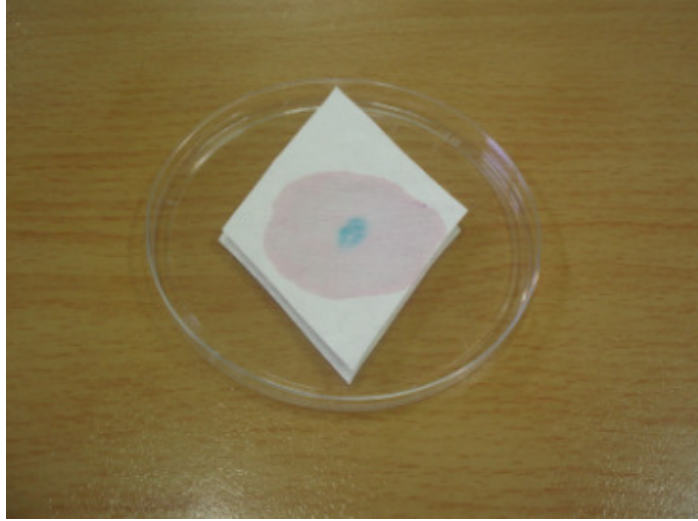
Akne şiddetlerine göre gruplandırılmış hastaların, 17' si (%30) hafif, 28' i (% 48) orta ve 13' ü (% 22) şiddetli grupta yer almıştır

4.1 Geleneksel Yöntemlerle Bakterinin Tanımlanması

Yapılan tanımlama testlerinde tüm kökenlerin aerotolerans testi ile anaerop oldukları belirlendikten sonra koloni morfolojileri gram pozitif difteroid basil görünümüleri, katalaz ve indol oluşturma özelliklerine göre *P.acnes* denmiştir.



Resim 4 *Propionibacterium acnes*' in koyun kanlı agardaki koloni görüntüsü



Resim 5 *Propionibacterium acnes*' in indol oluşturması

4.2 Genotipik Test Sonuçları

Tüm rnekler, *Propionibacterium acnes*' e özgü primerler kullanılarak PZR yöntemiyle genotiplendirilmiştir. Kökenlerin tamamı MMf+ - MMr+ ve PAR2-PR264 primeri ile çalışılmıştır. MMf+- MMr+ primeri ile 633 baz çiftlik bant oluşumu, kökenlere *Propionibacterim acnes* veya *Propionibacterium avium* adını koyarken, *P. acnes recA* genine özgü PAR2- PR264 primeri ile 334 baz çiftlik bant oluşumu kökenlerin *P. acnes* olduğunu doğrulamıştır. (Resim 6-7)

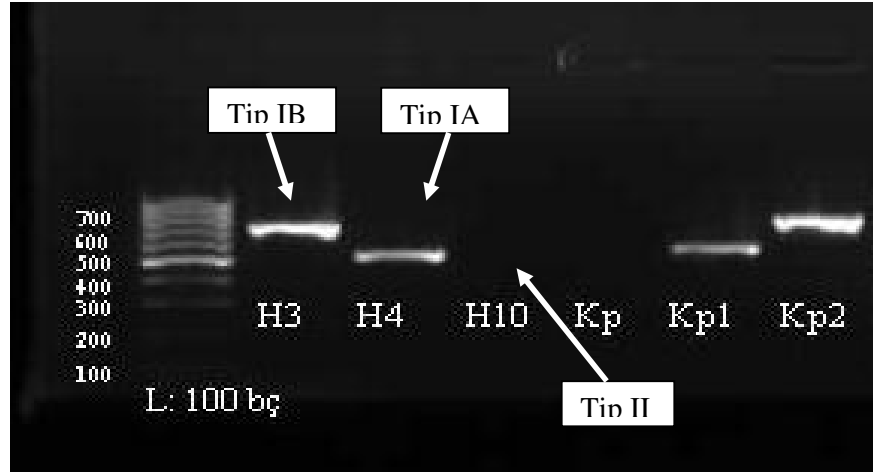


Resim 6 MMf+-MMr+ primeri ile PZR (633bp) ürünlerinin görüntüsü. L: 100 baz çiftlik belirteç, H: hasta, Kp: pozitif kontrol(ATCC 11828), Kn: negatif kontrol.



Resim 7 PAR2- PR264 primeri ile PZR (334bp) ürünlerinin görüntüsü. L: 100 baz çiftlik belirteç, H: hasta, Kp: pozitif kontrol(ATCC 11828), Kn: negatif kontrol.

PR219-PR220 primeri kullanılarak kökenlerin tümünde Tip IA ve Tip IB ayrımı yapılmıştır. PR 219- PR 220 primerleri ile 508 baz çiftlik bant oluşumu gözlenen kökenler Tip IA, 716 baz çiftlik kökenler Tip IB olarak belirlenirken bant gözlenmeyen kökenler ise Tip II olarak değerlendirilmiştir. (Resim. 8)



Resim 8 PR 219- 220 primeri ile PZR bant görüntüsü L: 100 baz çiftlik belirteç,H; hasta, Kp: ATCC 11828, Kp1: ATCC 11827, Kp2: *P. acnes* 6609

Tip II kökenlerini belirlemek için PR 245- PR247 primeri kullanılmış, 573 baz çiftlik bant oluşumu gözlenen kökenler Tip II olarak değerlendirilmiştir (Resim 9)



Resim 9 PR 245- PR 247 primeri ile PZR bant görüntüsü L: 100 baz çiftlik belirteç, K1: ATCC 11828, K2: ATCC 11827, K3: 6609

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bazı kökenlerin genotipik özelliklerinde farklılıklar gözlenmiştir Biri hasta grubundan, dördü kontrol grubundan olmak üzere toplam beş kişide iki farklı koloni morfolojilerine sahip kökenler izole edilmiştir. Moleküler yönden incelendiklerinde bu kişilerde farklı iki genotipin varlığı saptanmıştır (Tablo 8). Bulgularımız ele alındığında, bu kökenlerin dahil olduğu grupta istatistiksel değerlendirmenin doğru yapılamayacağı saptanmış ve bu kökenler istatistiksel değerlendirmenin dışında tutulmuştur.

Tablo 8 İstatistiksel değerlendirme dışı örnekler ve genotipik özellikleri

Kökenler *	Genotipik test sonuçları
H57	Tip IA- IB, Tip IB ve Tip II : Bant oluşumu gözlenmemiştir
H58-A	Tip IA
H58-B	Tip IB
C40-A	Tip IB
C40-B	Tip II
C41- A	Tip IA
C41-B	Tip II
C42-A	Tip IB
C42-B	Tip II
C43-A	Tip IA
C43- B	Tip IA- IB, Tip IB ve Tip II: Bant oluşumu gözlenmemiştir

*H; hasta, C; kontrol

Diğer yandan hastalardan (no:H57) ve kontrol grubundan (no: C43) birer kişiden izole edilen kökenlerin genetik analizi yapıldığında *Propionibacterium*'a özgü (MMf+- MMr+) ve *P.acnes recA* genine özgü (PAR2- PR264) primerleri ile PZR ürünleri elde edilmiş, ancak genotipler için kullanılan primerlerle herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 8). Bu iki kökenin PZR ile elde edilen *recA* geni hem ileri hem de geri primerleri kullanılarak her iki yönde otomatik dizi analizöründe dizilenmiştir (REFGEN firması-Ankara). Elde edilen dizileme sonuçları NCBI-Blast ile incelenmiştir. Kökenlerden H57, *P.acnes* TipI *rec A* dizisi ile % 99, C43 ise *P.acnes* Tip II *recA* geni ile %97 benzerlik göstermiştir.

Hastalar, akne lezyon tiplerine göre papülopüstüler ve nodülökistik olmak üzere iki gruba ayrılmış, genotiplerle lezyon tipine göre bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 9).

Tablo 9 Lezyon tipi ile genotip arasındaki ilişki

Genotip	Papülopüstüler	Nodülökistik
Tip IA	34	13
Tip IB	4	1
Tip II	3	1

Akne şiddetlerindeki genotip dağılımı Kolmogorov Smirnov iki örnekli testi ile çalışılmıştır. Değerlendirme yapılırken akne şiddetleri ikili gruplar halinde; hafif-orta, orta- şiddetli, hafif- şiddetli olarak ele alınmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. (Tablo 10)

Tablo 10 Lezyon şiddeti ile genotip arasındaki ilişki

Genotip	Hafif	Orta	Şiddetli
TipIA	14	22	11
TipIB	1	3	1
TipII	2	2	0

Hasta ve kontrol grubundaki bazı örneklerde *P. acnes* tek başına bulunurken, bazı örneklerde beraberinde farklı mikroorganizmaların da ürediği gözlenmiştir. Buna göre hasta grubunun sadece 10'un da *P.acnes* yalnız başına, 41'inde kogülaz negatif stafilokoklarla (KNS) beraber, 5'inde ise KNS ve non-hemolitik streptokoklarla birlikte bulunduğu görülmüştür. Benzer şekilde kontrol grubunda 13'ünde *P.acnes* saf olarak üretilmiş, 23'ünde *P.acnes* KNS ile beraber izole edilmiş, 3'ünde ise birer gram negatif basil, non-hemolitik streptokok ve gram pozitif difteroid basil beraber bulunmuştur. Herhangi bir *P. acnes* genotipi ile beraberinde mikroorganizma bulunma durumu araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir, ayrıca hasta ve kontrol grubu arasında da anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 11)

Tablo 11 Hasta ve kontrollerden izole edilen *P. acnes* suşlarının genotip dağılımı ve eşlik eden mikroorganizmalar

Genotipler	Hasta grubu		Kontrol grubu		Toplam
	Tek başına <i>P. acnes</i>	≥ 2 μ org	Tek başına <i>P. acnes</i>	≥ 2 μ org	
Tip IA	8	39	7	23	77
Tip IB	1	4	4	1	10
Tip II	1	3	2	2	8

Hasta grubundan, *P. acnes*' in başka bir mikroorganizma ile beraber bulunması halinde, akne şiddetine bir etkisinin olup olmadığı irdelenmiş anlamlı bir fark saptanmamıştır (Kolmogorov Smirnov testi ile, $p > 0.005$, Tablo 12)

Tablo 12 *P. acnes* ve eşlik eden mikroorganizmaların akne şiddetiyle ilişkisi

Akne şiddeti	Tek başına <i>P. acnes</i>	≥ 2 μ org.	Toplam
Orta	5	22	27
Hafif	4	13	17
Şiddetli	1	11	12

Hasta ve kontrol grubunda, *P. acnes* koloni sayıları belirlenmiş, genotip ile koloni sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. (Tablo 13)

Tablo 13 *Propionibacterium acnes* koloni sayısı ve genotip dağılımı

Koloni sayısı (Kob/ ml)	Hasta grubu			Kontrol grubu		
	Tip IA	Tip IB	Tip II	Tip IA	Tip IB	Tip II
10^2	4	1	1	7	0	0
10^3	20	3	0	8	1	1
$\geq 10^4$	23	1	3	15	4	3

Tablo 14 *Propionibacterium acnes* koloni sayısı ve akne şiddeti

Koloni sayısı (Kob/ ml)	Orta	Hafif	Şiddetli
10^2 kob/ ml	3	2	1
10^3 kob/ ml	12	5	6
$\geq 10^4$ kob/ ml	12	10	5

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Derinin normal florasında yer alan, bir takım fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilen *Propionibacterium acnes*, akne vulgaris oluşumunda önemli role sahip bir bakteridir. Akne özellikle yüzde, daha az sıklıkla sırt, göğüs ve omuzlarda da yer almaktadır. Çok çeşitli akne lezyonları görülmektedir. Bunlardan komedonların açık (siyah nokta) veya kapalı (beyaz nokta) şekilleri bulunmaktadır. Aknenin inflamatuvar lezyonları ise papül, püstül, kist veya nodüllerdir (9). Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların lezyon tipleri öncelikle, komedonal, papülopüstüler ve nodülökistik olmak üzere üç grupta toplanmıştır. Lezyon tiplerine göre 40 hastada papülopüstüler, 15 kişi de nodülökistik akne belirlenmiştir. Komedonal aknesi olan sadece bir kişi saptanmıştır. Yapılan istatistik testlerinden anlamlı sonuç elde edilebilmesi için bu komedonal aknesi olan kişi, papülopüstüler akneli grubuna dahil edilmiş, böylece lezyon tipine göre hastalar; papülopüstüler ve nodülökistik akneleri olanlar şeklinde iki grupta değerlendirilmiş. Genotip IA her iki grupta da birinci sırada yer almış (n:34 ve n:13), bunu Tip IB ve Tip II izlemiştir (Tablo 9). İki hasta grubunun lezyon tipleri ile lezyonlardan izole edilen *P. acnes* kökenlerinin genotipleri arasındaki ilişki araştırılmış, ancak yapılan istatistik testlerine göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Literatüre bakıldığında akne lezyon tipleri ile *P. acnes*' in genotipleri arasındaki ilişkiyi araştırarak herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Genetik bir çalışma olmamakla beraber, ülkemizden bir veriyi yansıtmaması bakımından önemli olan, Ergin ve ark. (38) tarafından yapılan çalışmada, farklı biyotip *P.acnes* kökenlerinin akne lezyonlarında bulunma oranı araştırılmıştır. Çoğu papülopüstüler ve nodülökistik lezyonları olan 64 hastadan izole edilen *P.acnes* kökenlerinin %62.5'i (n:40) biyotip I, %4.7'si (n:3) biyotip II, %31.3'ü (n:20) biyotip III, %1.6'sı (n:1) biyotip IV olarak saptanmıştır.

Benzer bir çalışma da Japonya'dan Kishishita ve ark. (29) tarafından, sağlıklı kişilerin yüz derilerinden izole edilen 128 *P.acnes* kökeninin, riboz, eritritol,ve sorbitolü fermente etme özellikleri, hücre duvarında galaktoz bulundurup bulundurmamalarına göre biyotipleri yapılmış, serotip IB1, IB3, IB4 ve IIB2'in diğer serotipler IB2 ve IB5'den daha fazla olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda akne lezyon tiplerinin yanı sıra, akne şiddeti belirlenerek genotiplerle olan bağlantısına bakılmıştır. Akne şiddeti belirlenirken GAGs yöntemi kullanılmıştır (35). Şiddet açısından hastalar arasında 27 kişi orta derece, 17 hasta hafif, 12 hasta şiddetli olarak tanımlanmıştır. Her hasta için belirlenen şiddet skoru ile bu hastalardan elde edilen kökenlerin genotipleri istatistiksel olarak ilişkilendirildiğinde anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Bizim sonuçların tersine, genetik bir çalışma olmamakla beraber bazı biyotiplerin daha şiddetli lezyonlar oluşturduğuna dair veriler bildirilmiştir. Higaki ve ark. (39) akne lezyonlarından izole ettikleri *P.acnes* kökenlerinden çoğunun biyotip 3 olduğunu bunu, biyotip 1 ve 2'nin izlediğini saptamışlardır. *P.acnes* biyotipinin (biyotip 1-5) lipaz aktivitesine ve aknenin kızarıklık derecesine etkisini incelemişler, Biyotip 3'ün daha şiddetli lezyonlar yaptığı, bu kökenlerin daha fazla miktarda butirik asit ve propionik asit ürettiklerini bulmuşlardır.

Bakterilerin virülans özelliklerinin araştırıldığı, sağlıklı kişilerin yüz derisinden izole edilen *P.acnes* kökenlerinin de yer aldığı bir başka çalışmada Frukowa ve ark. (40) , 35'i sarkoid lenf bezinden, 127'si başka vücut bölgelerinden izole edilen *P.acnes* kökenlerinin serotipleriyle, hücre kültürlerinde invazivlik özelliklerini kıyaslamışlardır. Her iki grupta serotip dağılımında bir farklılık görülmemiştir. Kökenlerin 112'sinde serotip I, 50'sinde ise serotip II tespit edilmiştir. Serotip I kökenlerinin %71'i hücre kültüründe invazivlik gösterirken, serotip II'nin hiçbirisinde invaziv özellik bulunmamıştır.

Bu çalışmada, non-invaziv kökenlerin PAmce ve PAP60 genlerinde delesyon, bu delesyona bağlı olarak, invazyonla ilişkili proteinlerin (invasion- associated proteins) bir veya daha fazla amino asidinde değişiklik görülmüştür. Çalışmamızda sadece moleküler testlerle genotiplemeye gidilmiştir, ancak karbohidrat fermentasyonu yapılmamıştır. Bu nedenle biyotipleme veya serotiplemeyle yapılmış çalışmaların bizim çalışmayla kıyaslanması gerçeği pek yansıtmıyor olabilir. Kökenlerimizin biyotiplendirilmesinin de yapılıp, genotiplerle serotiplerin beraberce lezyon şiddetindeki yerinin yeniden irdelenmesinde yarar vardır, bir sonraki hedeflerimiz içinde bulunmaktadır.

Farklı genotiplere sahip *P.acnes* ile yapılan bir kaç çalışma bulunmaktadır. Shannon ve ark. (37) yapmış oldukları çalışmada; Tip IA yüzeysel infeksiyonlarda daha fazla bulunurken, Tip IB ve Tip II' nin invaziv olgularda yaygın olduğu belirlenmiştir. Benzer bulgular Cohen ve ark. (32) yapmış oldukları başka bir çalışmada alınmıştır. Prostat dokularından alınan örnekler incelenmiş ve baskın olarak *P. acnes* (% 35) üretilmiştir. Yine aynı araştırmacılar, prostat kanserli hastaların radikal prostatektomi örneklerinde Tip IB ve Tip II nin baskın olarak izole edildiğini bildirmişlerdir. *P. acnes* in prostatik inflamasyonda yüksek derece etkili olabileceği dolayısıyla bu bakterinin prostat kanserinde rolünün olabileceği savunulmuştur. Sampedro ve ark. (34) ise ortopedik implantı olan hastalardan izole edilen *P. acnes* kökenlerinin infeksiyonla ya da kolonizasyonla olan ilişkisini araştırmışlardır. Buna göre çıkartılmış protezlerin yüzeyinden ürettikleri *P.acnes* kökenlerinin genotiplemesi yapılmış (Tip IA, IB, II ve III) ve infeksiyonla olan ilişkisi araştırılmıştır. En fazla *P. acnes* Tip I (% 62) bulunmuş ve bunu Tip II (% 38) takip etmiştir. Kolonizasyonda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. İnfeksiyon ve kolonizasyonda genotipler arasında ilişki saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda ise hasta grupları incelendiğinde Tip IA (47) nın baskın olarak gözleendiği, Tip IB (5) ve Tip II (4) nin daha az oranda olduğu saptanmıştır. Bu haliyle yüzeysel infeksiyonlarda TipIA' nın daha fazla görüldüğü sonucuna varılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Kültürle örneklerden *P.acnes*'in yalnız başına veya başka bir mikroorganizma elde edilmesi halinde akne şiddeti üzerine bir etkisinin olup olmadığı irdelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Koloni sayısının da klinik şiddete herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Klasik kitaplara göre bakteri yoğunluğu ve akne şiddeti arasında bir ilişki gözlenmediği belirtilmiştir. (1) Ancak bu bilgilerin tersine ülkemizde Bahar ve ark. yaptıkları çalışmada, folikül kültüründen *P.acnes*'in yalnız başına saf bulunması halinde lezyon şiddetinin daha fazla olacağını göstermektedir. (41)

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen bazı kökenlerde genotipik testler sonucu farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 8). Biri hasta grubundan, dördü kontrol grubundan olmak üzere beş kişide fenotipik olarak koloni morfolojileri farklı kökenler izole edilmiştir. Moleküler yönden incelendiklerinde bu kişilerde iki farklı genotipin varlığı saptanmıştır. Bu kişilerin kültürlerinde *P.acnes* diğer bir bakteri ile birlikte bulunmamıştır .

Diğer yandan hastalardan (no:57) ve kontrol grubundan (no: C43) birer kişiden izole edilen kökenlerin genetik analizi yapıldığında *Propionibacterium* özgülü (MMf+- MMr+) ve *P.acnes recA* genine özgülü (PAR2- PR264) primerleri ile PZR ürünleri elde edilmiş, ancak genotipler için kullanılan primerlerle herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Bu iki kökenin PZR ile elde edilen *recA* geni hem ileri hem de geri primerleri kullanılarak her iki yönde otomatik dizi analizöründe dizilenmiştir (REFGEN firması-Ankara).

Elde edilen dizileme sonuçları NCBI-Blast ile incelenmiştir. Kökenlerden 57 nolu örneğin rec A dizisi Tip I ile % 99, C43'ün ise *P.acnes* Tip II recA geni ile %97 benzerlik göstermiştir. Bu haliyle farklı bir genotip olduğu düşünülebilir. Bu kökenlerin ileri moleküler ve biyokimyasal testlerin yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda genotipler ile akne lezyonların şiddet skorları ve lezyon tipleri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bulgular, *P.acnes* genotipleri ile akne şiddeti arasında herhangi bir bağlantı göstermese de bu çalışma, şimdiye kadar moleküler araştırmalarla *P.acnes*'in genotiplemesinin yapılmadığı Türkiye için bir veri tabanı oluşturacaktır. Verilerimiz, bu farklı *P.acnes* genotiplerinin fenotipik özelliklerini incelemek ve akne şiddetiyle ilişkisini araştırmak için ileride yapılacak çalışmalarda yol gösterici olacaktır.

6. KAYNAKÇA

- 1- Zaenglein AL, Thiboutot DM. (2003). Acne Vulgaris. In: *Dermatology*. Eds: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini PR. Toronto. 532-543
- 2- Cotterill JA, Cunliffe WJ. (2003). Suicide in dermatological patients. *Br J Dermatol*, 137 (2): 246- 250
- 3- Dreno B, Poli F. (2003). Epidemiology of acne, *Dermatology*, 206 (1): 7- 10
- 4- Rzany B, Kahl C. (2006). Epidemiology of acne vulgaris, *J Dtsch Dermatol Ges*, 4(1): 8- 9
- 5- Odom RB, James WD, Berger TG. (2000). Acne Vulgaris. In: *Andrew's Diseases of the skin*, 9th ed, WB Saunders Co, Philadelphia, p. 284- 292
- 6- Ballanger F, Baudry P, Guyen JM, Kahmmari A, Dreno B. (2006). Heredity: a prognostic factor for acne, *Dermatology*, 212(2): 145- 149.
- 7- Voorhees JJ. (1972). Nodulocystic acne as a phenotypic feature of the XYY genotype. *Arch Dermatol* ,105: 913
- 8- Pawin H, Beylot C, Chivot M, Faure M, Poli F, Revuz J, Dreno B. (2004). Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments. *Eur J Dermatol*, 14: 4- 12
- 9- Erkin G, Boztepe G. (2004). Akne vulgaris. *Hac Tıp Der*, 35: 207- 211

- 10- Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, Rosenfield R. (2005). What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol*, 14(2): 143- 52
- 11- Cunliffe WJ, Simpson NB. (1998). Disorders of the sebaceous glands. In: *Rook/ Wilkinson/ Ebling. Textbook of Dermatology*, 6th ed, Eds: RH Champion, JL Burton, DA Burns, SM Breathnach. Oxford Blackwell Science. p.1940.
- 12- Guy R, Kealey T. (1998). The effects of inflammatory cytokines on the isolated human sebaceous infundibulum. *J Invest Dermatol*, 110: 410-5
- 13- Thiboutot D, Harris G, Iles V, Cimis G, Gilliland K, Hagari S. (1995) .Activity of the type 5- alpha- reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol*, 105: 209- 214
- 14- Canale D, Caglieresi C, Moschini C, Liberati CD, Macchia E, Pinchera A, Martino E. (2005). Androgen receptor polymorphism (CAG repeats) and androgenicity. *Clin Endocrinol* , 63 (3): 356- 61
- 15- Blauer M, Vaalasti A, Pauli SL, Ylikomi T, Joensuu T, Tuohimaa P. (1991). Localisation of androgen receptor in human skin. *J Invest Dermatol*, 97: 264-8
- 16- Freinkel RK, Strauss JS, Yip SY, Pochi PES. (1965). Effect of tetracycline on the composition of sebum in acne vulgaris. *N Engl J Med*, 273: 850- 854
- 17- Marples RR, Downing DT, Kligman AM. (1971). Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol* , 56: 127- 131
- 18- Eady EA, Ingham E. (1994)*Propionibacterium acnes* – friend or foe? *Rev Med Microbiol*, 5: 163- 73

- 19- Koneman EW, Allen SD, Tada WM, Schreckenberger PC, Winn WC. (1997). *Jr Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, P: 764
- 20- Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, DM., Baron, EJ., Wexler, HM. and Finegold, SM. (2002). *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*, 6th ed., Belmont CA: Star Publishing
- 21- . Oprica C. (2006). Characterisation of Antibiotic Resistant *Propionibacterium acnes* from Acne vulgaris and Other Diseases, Dermatology and Clinical bacteriology. Thesis. Karolinska Institutet Stockholm
- 22- Könönen E, Wade WG. (2007) *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive rods In: *Manual of Clinical Microbiology*. 9 th Ed: Murray PR, Baron EJ, Jorgense JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Washington DC: ASM Press, p: 872-888.
- 23- Finegold S M. (1977). *Anaerobic bacteria in human disease*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- 24- Cohen AL, Nizet V, Gallo RL. (2008). Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J. Dermatol*, 158(3): 442-55
- 25- Burkhardt CN, Burkhardt CG. (2003). Microbiology' sprinciple of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. *Int J Dermatol*, 42: 925- 7
- 26- Webster GF, Leyden JJ, Musson RA. (1985). Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to killing and degradation by human neutrophils and monocytes in vitro. *Infect Immun*, 49: 116-21
- 27- Cummins CS. (1975). Identification of *Propionibacterium acnes* and Related Organisms by Precipitin Tests with Trichloroacetic Acid Extracts. *J Clin Microbiol*, 2(2): 104–110

- 28- Webster GF and Cummins CS. (1978). Use of bacteriophage typing to distinguish *Propionibacterium acnes* types I and II. *J Clin Microbiol*, 7(1): 84–90.
- 29- Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y.(1979) .Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. *Appl Environ Microbiol*, 38(4): 585–589.
- 30- Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wezer A, Strittmatter A, Hujer S, Düre P, Gottschalk G. (2004). The Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Acnes*, a Commensal of Human Skin. *Science*, 305 ; 671- 673
- 31- Mcdowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney M. M, Glenn V. J, Mclorinan C.G, Bhatia A, Maisonneuve JF, Lodes M, Persing H.D, Patrick S. (2005). *Propionibacterium acnes* Types I and II Represent Phylogenetically Distinct Groups *J Clin Microbiol*, p: 326- 334
- 32- Cohen R J, Shannon A B, Mcneal J E, Shannon T, Garrett L K. (2005). *Propionibacterium acnes* associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution? *J Urol*, 173:1969- 1974
- 33- Mcdowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick SA. (2008). New phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *J Med Microbiol*, ; 57 (pt 2) : 218-24
- 34- Sampedro MF, Piper EK, Mcdowell A, Patrick S, MAndrekar NJ, Rouse SM, Steckelberg JM, Patel R. (2009). Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phylotypes associated with orthopedic implants, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 64:138- 145

- 35- Doshi A, Zaheer A, Stiller M J. (1997). A comparison of current acne grading systems and proposal of a novel system. *Int J Dermatol* ,36:416- 418.
- 36- Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. (1980). New medium for isolating propionibacteria and its application to assay of normal flora of human facial skin. *Appl Environ Microbiol*, 40:100-105.
- 37- Shannon AB, Cohen JR, Garrett LK. (2006). Polymerase chain reaction- based identification of *Propionibacterium acnes* types isolated from the male urinary tract: evaluation of adolescents, normal adults and men with prostatic pathology..*Br J Urol*,:98. 388- 392
- 38- Ergin C, Kaleli I, Sahin R, Ergin S, Kaçar N. (2006) Biotyping of *Propionibacterium acnes* strains isolated from patients with acne Vulgaris, *Mikrobiyol Bul*: 40(1-2):15-21.
- 39- Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. (2000).Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *J Dermatol*:27(8):519-22.
- 40- Furukawa A, Uchida K, Ishige Y, Ishige I, Kobayashi I, Takemura T, Yokoyama T, Iwai K, Watanabe K, Shimizu S, Ishida N, Suzuki Y, Suzuki T, Yamada T, Ito T, Eishi Y. (2009) Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism, *Microb Pathog*: 46(2):80-7.
- 41- Bahar H, Kalaycıyan A,Oğuz O, Torun M. M, Aydemir E. H. (2001) Akne Vulgarisin Şiddeti Üzerine Bakterilerin Etkisi. *T. Klin J Dermatol*, 11: 146- 149

