

XXXI. OTDK Biológia szekció

A *Propionibacterium acnes* filogenetikai jellemzése

Készítette: Magyar Márta, Biológus MSc, II. év

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai kar
Mikrobiológiai Tanszék

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet

Témavezető: Dr. Nagy István

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETŐ	4
1.1 A <i>Propionibacterium acnes</i> jellemzése	4
1.2 A <i>P. acnes</i> patogenezise	4
1.3 Az acne vulgaris jellemzése	4
1.4 <i>P. acnes</i> kölcsönhatása epidermális sejtekkel	5
1.5 <i>P. acnes</i> azonosítás és osztályozás	6
1.6 Acne vulgaris kezelése és antibiotikum rezisztencia.....	7
1.7 Mintavételezés, tenyésztés és meghatározás	8
2. CÉLKITŰZÉS.....	9
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	10
3.1 Felhasznált mikroorganizmusok és anyagok	10
3.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok	10
3.1.2 Felhasznált táptalajok, tápoldatok.....	11
3.1.3 Felhasznált antibiotikumok	11
3.1.4 PCR (Polymerase Chain Reaction) során felhasznált primerek.....	11
3.1.5 Nukleinsav elválasztáshoz használt oldatok, reagensek	12
3.2 Alkalmazott módszerek	13
3.2.1 Baktérium törzsek tenyésztése, fenntartása	13
3.2.2 Teljes nukleinsav izolálása.....	13
3.2.3 Filogenetikai analízis	13
3.2.4 Antibiotikum érzékenység	16
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	17
4.1 A törzsgyűjtemény jellemzése RAPD alkalmazásával.....	17
4.2 Multiplex PCR.....	18
4.3 eMLST (expanded Multilocus Sequence Typing).....	20
4.4 Klinikai minták tipizálása	21

4.5 Filogenetika	24
4.6 Antibiotikum érzékenység	26
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	30
6. IRODALOMJEGYZÉK.....	31
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	33
8. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ	34

1.BEVEZETŐ

1.1 A *Propionibacterium acnes* jellemzése

Bőrünkön, szervezetünk első védelmi vonalán kommenzalista és patogén mikroorganizmusok együttesen alakítanak ki dinamikus mikroflórát.

A *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) egy Gram pozitív, coryneform, nem spórázó, anaerob, opportunista baktérium [1,2]. Normál körülmények között kommenzalistaként más mikroorganizmusokkal együtt, mint pl. a *Staphylococcus epidermidis*, a *Micrococcus luteus* és a *Malassezia furfur*, az egészséges humán bőr mikrobiomjának részét képezi [3], de ezen kívül a kötőhártyában, a szájüregben és a külső hallójáratban is előfordul [4].

1.2 A *P. acnes* patogenezise

Korábban úgy vélték, hogy a *P. acnes* gyenge virulenciájú baktérium, azonban az utóbbi években egyre gyakrabban azonosítják különböző kórképekben [2]. Leggyakrabban az acne vulgaris (akne) kialakításában játszik szerepet, de összefüggésbe hozták más betegségekkel is, mint pl. a szaruhártyafekély, szívbelhártya gyulladás, csontvelőgyulladás, sarcoidosis, SAPHO szindróma (synovitis-acne-pustulosis-hyperostosis-osteitis), központi idegrendszeri fertőzések, orvosi implantátumokkal kapcsolatos gyulladások vagy a prosztataraák [5]. Azonban a *P. acnes* pontos szerepe a felsorolt betegségek patogenezisében nem pontosan ismert.

1.3 Az acne vulgaris jellemzése

Az acne vulgaris multifaktoriális eredetű, a pilosebaceous follikulusok krónikus gyulladásos betegsége. A pilosebaceous follikulusok szőrtüszőből, szőrszálból és faggyúmirigyből épülnek fel. A faggyúmirigyek - ezen belül az őket nagyrészt kialakító sebociták - fő feladata a faggyútermelés és kiválasztás. Az aknés elváltozások kialakulása főként a megnövekedett faggyú szekrécióval magyarázható, amely tápanyagforrásként szolgál a *P. acnes* számára, de további fontos patogén tényezők közé sorolható a kóros duktális keratinizáció és a *P. acnes* abnormális proliferációja [6]. A baktérium elsősorban a serdülőkorúak és a fiatal felnőttek olyan testfelületén kolonizál, amely gazdag faggyúmirigyekben, mint az arc-, homlok-, mellkas- és a hát bőrfelületei. Ritkán

életveszélyes, azonban az életminőséget jelentős mértékben befolyásolja fizikai és pszichológiai szempontból egyaránt [3].

Klinikai tekintetben az acne vulgaris három csoportra osztható: 1) acne comedonica: nyitott és zárt komedók jellemzik, amelyek változó számban és intenzitásban jelentkeznek elsősorban az arc területén; 2) acne papulopustulosa: a gyulladás előrehaladtával fájdalmas papullák jelennek meg, amelyek gyógyulás után gyakran hegeket, forradásokat hagynak maguk után; 3) acne conglobata: a legsúlyosabb forma amelyet komedók, pustulák, megkeményedett papulák és tályogok jellemzik kiterjedt bőrfelületeket érintve. Ez utóbbi esetében a hegek - amelyek nemcsak az arcon, hanem a háton és a tarkón is kialakulhatnak - igen szembetűnőek, jelentősen megváltoztatva az érintett bőrfelületek kinézetét (torz bőrfelület).

1.4 P. acnes kölcsönhatása epidermális sejtekkel

A bőr legkülső rétegének, az epidermisznek 95%-át a keratinociták alkotják. Korábban úgy vélték, hogy az epidermisz szerkezetének fenntartásában, citokeratinok termelésében játszanak szerepet és fizikai akadályként funkcionálnak különböző exogén mikroorganizmusokkal szemben. Később azonban megfigyelték, hogy a keratinociták valamint a szebociták immunológiailag aktív sejtek, amelyek képesek immunfolyamatokat aktiválni a mikroorganizmusokkal vagy ligandjaikkal való stimulálás hatására [7]. Ahogyan számos más immunsejt, a keratinociták és a szebociták is expresszálják az ún. mintázat felismerő receptorokat (Pattern recognition receptors; PRRs) mint pl. a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor; TLR). Ezek a sejtfelszíni vagy intracelluláris receptorok a kórokozók patogén-asszociált molekuláris mintázatait (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) ismerik fel. A PAMP-ok közé soroljuk, többek között, az elsősorban Gram-negatív baktériumok által expresszált lipopoliszacharidot (LPS) vagy a Gram-pozitív baktériumok sejtfalalkotóját a peptidoglükánt (PGN). A receptor-ligand keresztkötés következtében aktivált sejtek effektor molekulákat, pl. gyulladás-keltő és gátló citokineket (pl. tumor nekrosis faktor- α ; TNF- α , interleukin-10; IL-10) és kemokineket (pl. interleukin-8; IL-8) valamint antimikrobiális peptideket (pl. humán β -defenzin-2; hBD-2) szekretálnak [7]. Mivel azonban a bőr strukturális sejtjei korántsem képesek olyan mennyiségű effektor molekulát termelni, mint pl. a professzionális immunsejtek (mint pl. a T-sejtek vagy a dendritikus sejtek) ezért félprofesszionális immunsejteknek tekinthetők, amelyek professzionális immunsejteket

toboroznak a gyulladás területére [3]. Habár immunválaszuk lassúbb és lényegesen kevesebb effektor molekulát képesek szekretálni, a kórokozók elleni harcban jelentős szerepet töltenek be. Az epidermális eredetű sejtek immunválaszának a specifikusságáért a különböző PRR kombinációkon keresztül aktiválódó jelátvivő útvonalak a felelősek. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak, hogy az epidermális sejtek - eddig ismeretlen molekuláris mechanizmuson keresztül - meg tudják különböztetni a kommenzalistákat a kórokozóktól [7].

Habár az akne súlyossága és az adott területen található *P. acnes* sejtszáma közötti összefüggés máig vitatott, az utóbbi években elvégzett tanulmányok azt mutatják, hogy a *P. acnes* képes indukálni a keratinociták és szebociták proliferációját, differenciálódását valamint immunaktivációját [3,7,8]. Fontos kiemelni ugyanakkor, hogy élő *P. acnes*-el történő fertőzést követően a keratinociták és a szebociták *in vitro* hBD-2, IL-8, IL-1 α és involucrin expressziója izolátum specifikus mintázatot mutat [9]. Amíg ugyanis a RAPD alapján (lásd később) IA filogenetikai típusba sorolt 889 és 2005 izolátumok jelentősen megemelték a keratinociták hBD-2 valamint involucrin expresszióját, addig az adott 2 gén kifejeződését sem az IB típusú 6609-es, sem a II típusú ATCC11828 törzs nem indukálta. Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy az eltérő filogenetikai típusokba sorolt *P. acnes* törzsek eltérő genomjuk révén más-más molekulákat expresszálnak, ezáltal a gazda-sejtekkel (elsősorban az epidermális sejtekkel) való kölcsönhatásuk során a kommenzalisták esetében tolerogenitást, a patogének esetében gyulladást váltanak ki.

1.5 *P. acnes* azonosítás és osztályozás

A *P. acnes* izolátumok más mikroorganizmusoktól való elkülönítése évekig a bakteriális 16S rDNS amplifikációjával és szekvenciájának meghatározásával történt olyan univerzális primerek használatával, amelyek a gén egy nagyon konzervált, 1484 bázispár hosszúságú régióját célozzák [10]. A magas fokú konzerváltság, valamint a vizsgált szekvencia rövidege azonban rendkívüli módon korlátozza az egyes törzsek közötti különbségek meghatározásának lehetőségét. Perry és munkatársai [2] éppen a felbontás megnövelése érdekében adoptálták a RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) módszert. A módszer random DNS szegmensek amplifikációján alapul, amelyeket egyetlen rövid (10 nukleotid hosszú) oligonukleotid primer segítségével amplifikálunk: mivel rendkívül rövid, az adott primer számtalan sense és antisense helyre képes bekötni a genomba. Az amplifikált termékek gélen való megfuttatása révén az eltérő mintázatot mutató törzsek

elkülöníthetők egymástól. A RAPD előnye, hogy a hagyományos PCR alapú vizsgálatoktól eltérően nem igényli a célszervezet teljes genomjának ismeretét [11]. Hátránya azonban, hogy nem teszi lehetővé egyetlen bázis változás észlelését a genomi DNS-ben, mivel az amplifikáció nem mindig tökéletes párosodás eredménye a primer és templát DNS között. Mivel a módszer nehezen reprodukálható és a RAPD markerek alacsony információtartalommal rendelkeznek [3], a módszer nem a legalkalmasabb a *P. acnes* filogenetikai analízisére.

1998-ban a *Neisseria meningitidis* baktérium filogenetikai osztályozására dolgozták ki az úgynevezett Multi-lókusz Szekvencia Tipizálási sémát (Multi-Locus Sequence Typing; MLST), amelyet azóta számos környezeti és patogén baktérium esetén alkalmaztak. Laboratóriumunk részt vett az MLST *P. acnes*-re való adaptációjában [4] amely 7 konzervált háztartási gén részleges nukleotid szekvencia analízisen alapszik és lehetővé teszi az izolátumok molekuláris szinten történő összehasonlító jellemzését. Mivel a molekuláris tipizálás DNS szekvencia alapú, ezáltal reprodukálható és megbízható osztályozási rendszert biztosít. A módszer során a genomi DNS-ből az *aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *recA* és *sodA* gének részleges szekvenciáit amplifikáljuk, majd kapilláris elektroforézis szekvenálással meghatározzuk a pontos nukleotid sorrendet. Az egyes allél kombinációk szekvencia típusokba (ST) sorolhatóak, amelyek segítségével 4 filogenetikai csoport (IA, IB, II, III) különíthető el [4].

1.6 Acne vulgaris kezelése és antibiotikum rezisztencia

Habár hosszú éveken át kétségbe vonták a *P. acnes* szerepét az acne vulgaris kialakulásában, mégis a *P. acnes* számának csökkentését előidéző terápiák mutatkoztak a leghatásosabbaknak az aknés betegek kezelésében. Ezek a terápiák a *P. acnes* növekedésének és/vagy metabolizmusának megzavarásával működnek és két fő kategóriába sorolhatók: antibiotikumok (pl. tetracyclin, erythromycin) és nem-antibiotikus gyógyszerek (pl. retinoidok, benzoil-peroxid (BPO)). Az antibiotikumokat több mint 40 éve használják és még mindig széles körben alkalmazzák lokális és szisztémás formában is. Egészen a késői 1970-es évekig a *Propionibacterium*ok érzékenyek voltak a terápiásan használt antibiotikumokra, később azonban összefüggést találtak az antibiotikumokkal történő kezelésekre adott válasz hiánya és a rezisztens törzsek megjelenése között [12]. Manapság a *P. acnes* antibiotikum rezisztenciája világméretű problémát jelent az akne kezelésében, amely kialakulását számos

tényező segítheti elő. Például az antibiotikum alacsony dózisa és az elnyújtott idejű alkalmazása hozzájárulhat a rezisztens törzsek kolonizációjához; a hatóanyaguk tekintetében különböző antibiotikumok folyamatos, egyidejűleg történő alkalmazása pedig multirezisztens törzsek kialakulásához vezethet [13]. Mindezt alátámasztja, hogy az antibiotikumokkal kezelt betegek esetén szignifikánsan gyakrabban izoláltak rezisztens törzseket, mint az antibiotikum kezelésben nem részesült betegek körében [13].

1.7 Mintavételezés, tenyésztés és meghatározás

Az aknéban szenvedő betegekről származó izolátumok mintavétele jelenleg egy ún. törléses módszerrel történik, amely során a törlésről származó mikroorganizmus-elegyet táptalajra kenik és anaerob körülmények között tenyésztik tovább. Jelenleg azonban még nem létezik olyan szelektív táptalaj, amelyen kizárólag a *P. acnes* nőne; ezért a jelenleg használt szemi-szelektív táptalajon számos más organizmus (pl. további *Propionibacterium* fajok vagy *Staphylococcus epidermidis*) kinő a *P. acnes* mellett. Amíg a *Staphylococcus epidermidis* egészen más telep-szerkezetet és -színt mutat, addig pl. a *P. avidum* telepei megkülönböztethetetlenek a *P. acnes* telepeitől.

Az 1.4 fejezetben leírt eredmények valószínűsítik, hogy kommenzalista és patogén *P. acnes* törzsek is léteznek. Feltételezzük, hogy akne esetében nem a teljes bőrfelület *P. acnes* kolonizációja változik meg, hanem csak egyes follikulusokban képesek a patogén törzsek túlnőni a kommenzalistákat. Ebben az esetben a törléses módszerrel végzett mintavétel és a kizárólag tenyésztésen alapuló *P. acnes* azonosítás nem ad megfelelő felbontású képet a *P. acnes* kolonizációról. A potenciálisan patogén törzsek biztos elkülönítése érdekében elengedhetetlen, hogy a mintavétel az érintett terület specifikus régióiból történjen pl. a papulából, pustulából vagy a komedóból.

2. CÉLKITÚZÉS

Mivel a munkánk megkezdésekor rendelkezésre álló *P. acnes* azonosítási és osztályozási módszerek nem biztosítottak megfelelő felbontást, amellyel a kommenzalista és patogén törzsek egyértelműen elkülöníthetőek lettek volna, ezért munkánk céljaként olyan módszerek kifejlesztését tűztük ki, amelyek a *P. acnes* izolátumok gyors és megbízható azonosítását és osztályozását biztosítják.

Laboratóriumunk előzetes eredményei alapján az antibiotikum rezisztenciát mutató *P. acnes* törzsek kizárólag az I-es filogenetikai csoportba tartoznak. Mivel az általunk kifejlesztett módszerek alkalmasak az I-es csoportba tartozó törzsek további szétbontására, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az antibiotikum rezisztenciát mutató *P. acnes* törzsek specifikusan egy adott csoportba, vagy a teljes I-es csoportban szétszórtan találhatóak-e: ehhez számos törzsnek meghatároztuk az antibiotikum érzékenységet.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált mikroorganizmusok és anyagok

3.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok

3.1.1.1 RAPD analízis

Propionibacterium acnes törzsek

IA típus: PRP-60, 157256, 317669, 226, 434, PRP-38, 33257

IB típus: 6609, 51318, 887674

II típus: ATCC11828, PRP-47, 299038, 7751723, 10281614, 10334913

III típus: Asn12, 12S

Propionibacterium avidum törzsek:

87229417, 9880, 33810, 440671

3.1.1.2 Multiplex PCR

IA₁ típus: L1958, W633, PV40

IA₂ típus: 1A, 10S, 12C

IB típus: Asn40, Asn55, Asn86

IC típus: PRP-38, 5/1/3, 5/1/5

II típus: SG2, ATB1, ET1

III típus: 12S, 17S, 20C

3.1.1.3 eMLST

IC típus: 5/1/3

3.1.1.4 Antibiotikum érzékenység

IA₁ típus: 434, 226, PRP-60

IC típus: 5/1/3, 5/1/5

III típus: 12S

3.1.2 Felhasznált táptalajok, tápoldatok

3.1.2.1 Véres–agar táptalaj

4% Columbia agar
2, 5% Defibrinált marhavér
1,2% Lizált marhavér
0, 36 g/ml L-cisztein
1 mg K-vitamin
5% Dextróz

3.1.2.2 BHI (Brain- Heart-Infusion) tápoldat

3% BHI kivonat
10% élesztő kivonat
0, 5% Hemin 1 M- os NaOH- ban oldva
1 mg K-vitamin

3.1.3 Felhasznált antibiotikumok

Erythromycine (Sigma)
Tetracycline (Sigma)
Moxifloxacin (Avelox)
Lymecycline (Tetralysal)

3.1.4 PCR (Polymerase Chain Reaction) során felhasznált primerek

3.1.4.1 RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

1254: 5'-CCGCAGCCAA-3'

3.1.4.2 Multiplex PCR

<u>PArA-1 FORWARD</u> :	5'-AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA-3'
<u>PArA-2 REVERSE</u> :	5'-CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT-3'
<u>PAABC-1 FORWARD</u> :	5'-GCGTTGACCAAGTCCGCCGA-3'
<u>PAABC-2 REVERSE</u> :	5'-GCAAATTCGCACCGCGGAGC-3'
<u>PASo-3 FORWARD</u> :	5'-CGGAACCATCAACAAACTCGAA-3'

<u>PASo-4 REVERSE:</u>	5'-GAAGAACTCGTCAATCGCAGCA-3'
<u>PAHvp-1 FORWARD:</u>	5'-AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG-3'
<u>PAHvp-2 REVERSE:</u>	5'-ACCCTCCAAGTCAACTCTCCGCCT-3'
<u>PAAt-1 FORWARD:</u>	5'-TCCATCTGGCCGAATACCAGG-3'
<u>PAAt-2 REVERSE:</u>	5'-TCTTAACGCCGATCCCTCCAT-3'
<u>PARcA-1 FORWARD:</u>	5'-GCGCCCTCAAGTTCTACTCA-3'
<u>PARcA-2 REVERSE:</u>	5'-CGGATTTGGTGATAATGCCA-3'

3.1.4.3 eMLST (expanded Multilocus sequencing typing)

Lókuszok:	<u>aroE FORWARD:</u>	5'-GTGATTGGCCATCCAGTG-3'
	<u>aroE REVERSE:</u>	5'-CGCTGTGGACCTCAAAAC-3'
	<u>atpD FORWARD:</u>	5'-AATTACCCCCGAGACGAA-3'
	<u>atpD REVERSE:</u>	5'-CGTGTCTCTGGGACAGGAA-3'
	<u>gmk FORWARD:</u>	5'-TAGCCATCCGGAGATCGT-3'
	<u>gmk REVERSE:</u>	5'-GCGCAACTGCGTGATCTA-3'
	<u>lepA FORWARD:</u>	5'-TCGCGCCCAGTACTTAGA-3'
	<u>lepA REVERSE:</u>	5'-CGGATTTCCACTCGATCA-3'
	<u>sodA FORWARD:</u>	5'-TGGAAGTGCACCATGACA-3'
	<u>sodA REVERSE:</u>	5'-GCTAACGACGTTCCACCA-3'
Gének:	<u>tly FORWARD:</u>	5'-CAGGACGTGATGGCAATGCGA-3'
	<u>tly REVERSE:</u>	5'-TCGTTTACAAGACCACAGTAGC-3'
	<u>camp2 FORWARD:</u>	5'-ATCGTAGCCATACACCACACG-3'
	<u>camp2 REVERSE:</u>	5'-GCACCGAGTGTTGATGTCAATTAGC-3'

3.1.5 Nukleinsav elválasztáshoz használt oldatok, reagensok

Agaróz gél: 10 mM dinátrium-tetraborát puffer
1% vagy 2% agaróz
1 µg/ml etídium bromid

„Loading” puffer: 30% szacharóz
0,01% brómfenolkék

Molekulasúly markerek: 1 kb, 100 bp és 50 bp DNA ladder (Fermentas)

3.2 Alkalmazott módszerek

3.2.1 Baktérium törzsek tenyésztése, fenntartása

Az összes baktérium törzset anaerob véres agaron növesztettük 37°C-on, 3-5 napig, 10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂ tartalmazó anaerob kamrában. A törzsek replikátumait -80°C-on BHI tápoldatban tároltuk, amely 12% (v/v) glicerolt tartalmazott. Nukleinsav izoláláshoz a törzseket 5 ml BHI tápoldatban tenyésztettük.

3.2.2 Teljes nukleinsav izolálása

Kettő ml 24 órás tenyészetből centrifugálással kiülepítettük a sejteket (5 perc, 5000 rpm), a felülúszót eltávolítottuk majd 20 mg/ml lizozim enzimes oldattal 37°C-on 1 órán át tártuk fel a sejteket, végül centrifugálással kiülepítettük a feltáródott sejteket. A genomi DNS tisztítást az Aqua-Genomic Kit (MultiTarget Pharmaceuticals) felhasználásával végeztük a gyártó leírása szerint; röviden: 200 µl Aqua Genomic kit oldatában felfuszpendáltuk a feltáródott sejteket, majd 90°C-on 30 percig inkubáltuk őket. Ezt követően, 15 perc 13000 rpm-el centrifugálással a sejtörmelékeltávolítottuk, majd a felülúszóból 70 térfogat százaléknyi izopropanollal kicsaptuk a DNS-t. Háromszori 75% etanollal történő mosás után a kinyert nukleinsav mennyiségétől függően 50-70 µl bidesztillált vízben felfuszpendáltuk a pelletet, majd NanoDrop-al (Thermo Scientific) és/vagy Qubitál (Life Technologies) meghatároztuk a koncentrációt.

3.2.3 Filogenetikai analízis

3.2.3.1 RAPD

Reakcióelegy (20 µl végtérfogatban):

- 4 µl 5x puffer
- 2 µl 10 mM dNTP mix
- 2 µl 10 mM MgCl
- 1 µl templát gDNS (50 ng /µl)
- 0,2 µl Go Taq Polimeráz
- 1 µl 100 pM RAPD primer

A PCR program lépései: 1. elődenaturáció: 94°C 4,5 perc; 2. denaturáció: 94°C 30 mp; 3. annealing: 20°C, 2 perc 4. polimerizáció: 72°C, 2 perc; 5. 2-4 lépések megismétlése 5 alkalommal; 6. denaturáció: 94°C 30 mp; 7. annealing: 32°C, 1 perc; 8. polimerizáció: 72°C, 2 perc; 9. 6-8 lépések megismétlése 35 alkalommal; 10. utópolimerizáció: 72°C, 5 perc.

Az amplikonokat alacsony áramerősséggel 2%-os agaróz gélen választottuk el.

3.2.3.2 Multiplex PCR

Reakcióelegy (10 µl végtérfogat):

2 µl 5x puffer

0,1 µl 25 mM dNTP mix

0,3 µl 50 mM MgCl

0,1 µl Go Taq Polimeráz (Promega)

6,4 µl primer-mix

1 µl templát DNS (50 ng /µl gDNS vagy 40 µl desztillált vízben

felszuszpendált *P. acnes* kolónia 1 µl-e)

1. Táblázat. A Multiplex PCR reakció során felhasznált primerek végkoncentrációi

Primerek	Végkoncentráció
PArA-1 PArA-2	0,2 µM
PAABC-1 PAABC-2	0,25 µM
PASo-3 PASo-4	0,6 µM
PAHvp-1 PAHvp-2	0,1 µM
PAAAt-1 PAAAt-2	0,15 µM
PARcA-1 PARcA-2	0,25 µM

A PCR program lépései: 1. elődenaturáció: 94°C 1 perc; 2. denaturáció: 94°C 30 mp; 3. annealing: 66°C, 30 mp; 4. polimerizáció: 72°C, 1 perc; 5. 2-4 lépések megismétlése 14 alkalommal; 6. denaturáció: 94°C 30 mp; 7. annealing: 62°C, 30 mp; 8. polimerizáció: 72°C, 1 perc; 9. 6-8 lépések megismétlése 11 alkalommal; 10. utópolimerizáció: 72°C, 10 perc. A

mintákat 4°C-on tároltuk felhasználásukig, majd a továbbiakban 50 bp-os DNS marker (Fermentas) mellett 1% agaróz gélen választottuk el állandó (100V) áramerősséggel.

3.2.3.3 eMLST

Laboratóriumunk korábbi, teljes genom szekvenálásokból nyert adatai lehetőséget biztosított számunkra, hogy kiválasszuk azokat a géneket, amelyek segítségével kifejleszthettük a tipizálási sémát. Hat háztartási gén részleges és 2 gén teljes szekvenciáját használtuk fel az eMLST kidolgozásához. A PCR reakció után az amplikonokat 1%-os gélen megfuttattuk, kivágtuk, oszlopos módszert felhasználva kitisztítottuk (Geneaid) végül a szekvenciát kapilláris elektroforézis (3500 Series Genetic Analyzer, Life Technologies) módszerrel meghatároztuk. A kinyert szekvenciákat CLC Genomic Workbench szoftverrel illesztettük, majd hasonlítottuk össze a referencia adatainkkal. Az MLST adatbázisba (<http://pubmlst.org/pacnes/>) történő feltöltés után meghatároztuk az izolátumok szekvencia típusait (Sequence Type; ST).

Reakcióelegy (15 µl végtérfogat):

3 µl 5x puffer
1,5 µl 2,5 mM dNTP mix
1,5 µl 25 mM MgCl₂
1 µl templát gDNS (50 ng /µl)
0,1875 µl Go Taq polimeráz (Promega)
1,875 µl 10 pM primer

A PCR program lépései: 1. elődenaturáció: 95°C, 3 perc; 2. denaturáció: 95°C, 30 mp; 3. annealing: 56-58°C, 15 mp; 4. 3 lépés ismétlése 30 alkalommal; 5. polimerizáció: 72°C, 1 perc 10 mp; 6. utópolimerizáció: 72°C, 7 perc.

2. Táblázat. Az eMLST során a különböző lókuszok/gének amplifikációjára felhasznált primerek annealing hőmérsékletei

Lokusz/gén	Annealing (°C)
<i>aroE</i>	56
<i>atpD</i>	56
<i>gmk</i>	58
<i>guaA</i>	58

<i>lepA</i>	57
<i>sodA</i>	58
<i>tly</i>	57
<i>camp2</i>	58

3.2.4 Antibiotikum érzékenység

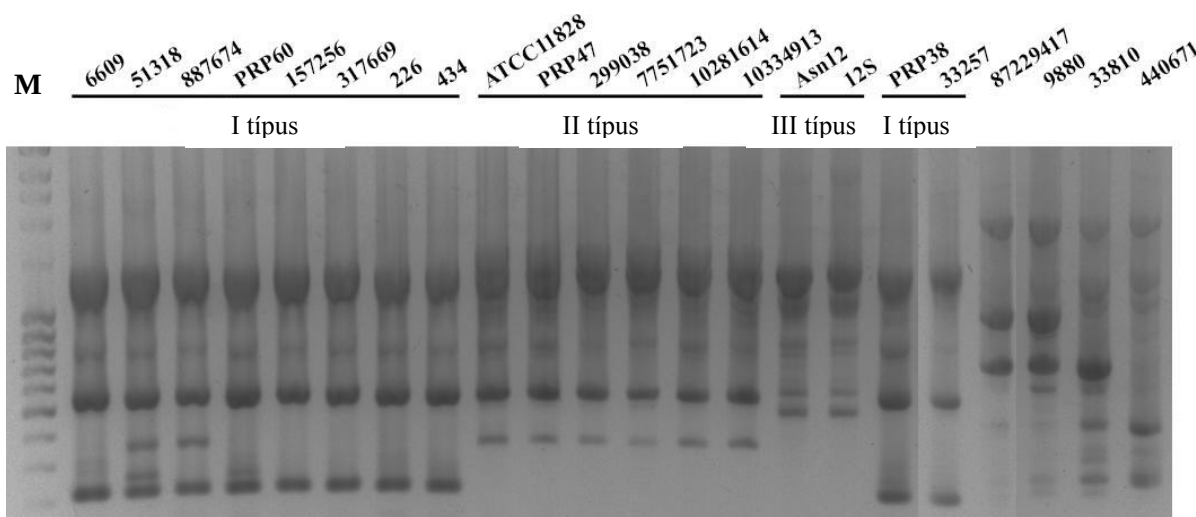
Az exponenciális (OD: 0,4-0,6) fázisig növesztett *P. acnes* törzseket masszívan oltottuk anaerob véres agar lemezek felületére. A baktérium szuszpenziót steril szűrőpapírral leitattuk, majd beszáradás után levágott pipettahegy végével lyukat fúrtunk a táptalajba és a 3.1.3 fejezetben felsorolt antibiotikumokat az adott koncentrációban a lyukakba csepegtettük; kontrollként az antibiotikumok oldószerét használtuk. Az így elkészített csészéket 3-5 napig inkubáltuk anaerob körülmények között.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 A törzsgyűjtemény jellemzése RAPD alkalmazásával

Ahhoz, hogy a későbbiekben meg tudjuk állapítani az általunk fejlesztett módszerek megbízhatóságát, a rendelkezésünkre álló törzsgyűjteményt a Perry és munkatársai által leírt RAPD módszerrel szűrtük [2]. Ennél a módszernél elengedhetetlen a megfelelő reakció körülmény és a DNS templát mennyiségének helyes megválasztása, így ebben a dolgozatban csak egy reprezentatív kísérlet eredménye kerül bemutatásra (1. Ábra). A kiválasztott 22 klinikai izolátumból, amelyeket telepmorfológia alapján *Propionibacterium*-ok közé soroltunk, a RAPD csak 18-at azonosított *P. acnes*-nek. A módszer alacsony felbontását tükrözi, hogy habár a PRP-38 és a 33257 törzsek amplikon mintázata elsősorban az I-es típusba tartozó törzsekhez hasonlít, mégsem tudtuk őket teljes biztonsággal besorolni. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy a RAPD módszerrel a *P. acnes* törzsek 3 fő típusba sorolhatóak, nevezetesen az I-es, a II-es és a III-as típusba.

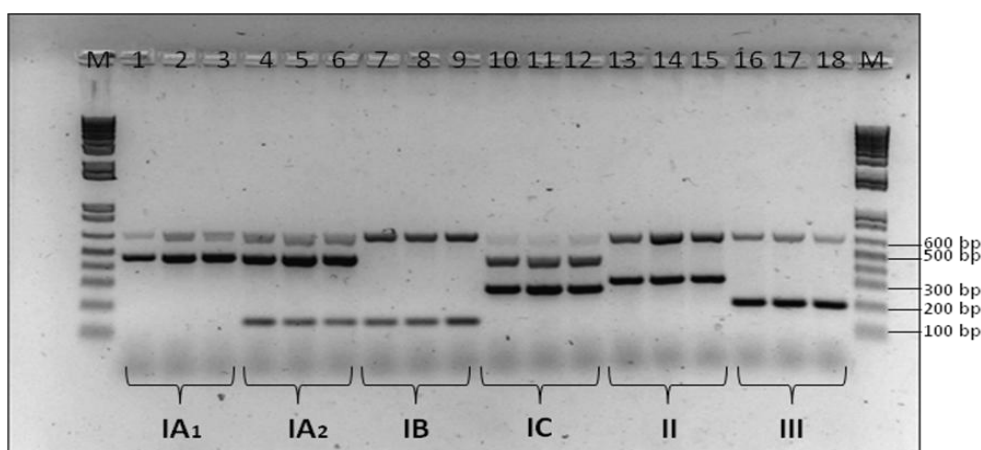
Habár mind a telepek mind az egyedi sejtek morfológiája teljesen megegyezett a *P. acnes*-el, 4 törzs teljesen más RAPD amplikon mintázatot mutatott - többek között hiányzik a *P. acnes*-re jellemző 1400 bp méretű amplikon. A 16S rRNS kapilláris elektroforézises szekvenálásával végül megállapítottuk, hogy ezek *P. avidum* izolátumok.



1. Ábra. 22 *Propionibacterium* izolátum RAPD analízise. 18 *P. acnes* és 4 *P. avidum* izolátum RAPD amplikon mintázata. A RAPD képes a *P. acnes* izolátumokat a 3 fő típusba sorolni, azonban egyes törzsek amplikon mintázata (pl. 6609, PRP38, 33257) nem elég konkluzív ahhoz, hogy az I-es típuson belül tovább csoportosítsa a törzseket.

4.2 Multiplex PCR

Munkacsoportunk 2005-ben elsőként írta le, hogy a kommenzalistaként számon tartott *P. acnes* különböző izolátumai eltérő immunválaszt váltanak ki keratinocitákban és szebocitákban. Az akkori vizsgálat szerint az IA típusba tartozó 2 izolátum indukálta az immunválaszt, míg az IB és a II-es típusú törzsek nem [9]. A RAPD azonban az I-es típuson belül nem alkalmas az izolátumok további kategorizálására, amelyre a 7 génes MLST [4] igen, azonban ez utóbbi összetettsége miatt nem alkalmas a klinikai izolátumok gyors jellemzésére. Ezért a laboratóriumunk rendelkezésére álló >30 *P. acnes* izolátum teljes genomszekvenciájának felhasználásával a belfasti Egyetem Immunológiai Intézetével közösen olyan módszert dolgoztunk ki, amely a genomokban meglévő különbségekre építve képes meghatározni az adott *P. acnes* izolátum pontos filogenetikai típusát. A módszer, amely egy klasszikus touchdown multiplex PCR, 6 primerpár segítségével egyetlen reakcióban képes rendkívül megbízhatóan besorolni - a jelenleg ismert 6 fő típusba - a klinikai izolátumokat.



2. Ábra. A multiplex PCR során generált amplikonok specifikusan jelölik az egyes *P. acnes* filogenetikai típusokat. A 677 bp amplikon specifikusan a *P. acnes* 16S rRNS-ét jellemzi. Az 1-3 oszlopban az IA₁ (1: L1958, 2: W633, 3: PV40), a 4-6 oszlopban az IA₂ (4: 1A, 5: 10S, 6: 12C), a 7-9 oszlopban az IB (7: Asn40, 8: Asn55, 9: Asn86), a 10-12 oszlopban az IC (10: PRP-38, 11: 5/1/3, 12: 5/1/5), a 13-15 oszlopban a II (13: SG2, 14: ATB1, 15: ET1) és a 16-18 oszlopban a III (16: 12S, 17: 17S, 18: 20C) típusba tartozó törzsek specifikus amplikon-mintázata látható; M: 100 bp marker.

A 2. Ábrán 1-18-ig számozva különböző *P. acnes* izolátumok multiplex PCR utáni amplikon mintázata látható: a 677 bp-nál látható amplikon a *P. acnes* 16S rDNS-ének egy adott szakasza: ez az ábrán minden izolátumnál látható. Ezt a primerpárt úgy terveztük, hogy kizárólag a *P. acnes* rDNS-éhez kötődve képes csak amplifikálni az adott szakaszt. Az 1-3

oszlopokban az IA₁ típusú törzsek jellegzetes amplikon mintázata látható: ebben az esetben a további 5 primerpár kizárólag a ABC transzporter 494 bp-os szakaszát képes amplifikálni. A 4-6 oszlopokban az IA₂ típusú izolátumok láthatóak, amelyekben az ABC transzporter mellett a *sodA* 145 bp-os szakasza is amplifikálódik. A 7-9 számozású oszlopokban IB típusú izolátumok láthatóak, amelyeket a 16S rRNS mellett a *sodA* 145 bp méretű amplikonja jellemez. A 10-12 oszlopokban az IC típusú izolátumokat jellemző amplikon mintázat látható, amelyekben az ABC transzporter 494 bp-os valamint a hipotetikus virulencia gén 305 bp-os amplikonjai láthatóak. A 13-15 oszlopokban a II típusú *P. acnes* törzsek láthatóak az amplifikálódott *atpD* 351 bp-os target szakasszal. Végül a 16-18 oszlopokban a III-as típusú izolátumok láthatóak, amelyek mintázatát a *recA* gén 225 bp-os amplikonja jellemzi. A 3. Táblázatban összesítettük a primerek specificitását valamint a target régiókat és az amplikonok méretét.

3. Táblázat. A multiplex PCR-ben használt primer párok jellemzői.

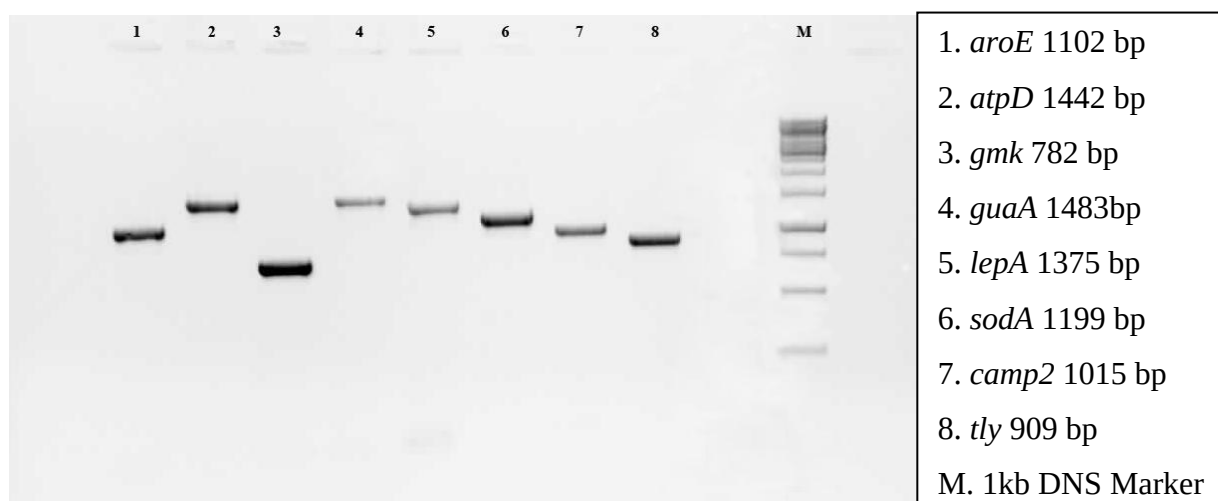
Primer	Specificitás	Target régió	Amplikon (bp)
PArA-1 PArA-2	<i>P. acnes</i>	16S rDNS	677
PAABC-1 PAABC-2	Filotípus IA _{1/2}	ABC transzporter	494
PASo-3 PASo-4	Filotípus IA ₂ és IB	<i>sodA</i>	145
PAHvp-1 PAHvp-2	Filotípus IC	Hipotetikus virulencia gén (hvp)	305
PAAAt-1 PAAAt-2	Filotípus II	<i>atpD</i>	351
PARcA-1 PARcA-2	Filotípus III	<i>recA</i>	225

Megállapítható tehát, hogy a multiplex PCR alkalmazásával kiküszöbölhető a RAPD tipizálás összes hátránya, vagyis az általunk kidolgozott módszer gyors, reprodukálható és a jelenleg ismert típusokat egyetlen reakcióban nagy megbízhatósággal azonosítja. Annak érdekében, hogy tovább gyorsítsuk a frissen izolált klinikai törzsek tipizálását tovább optimalizáltuk a multiplex PCR-t, így immáron genomi DNS tisztítás nélkül kolóniából is működik a reakció.

A multiplex PCR alkalmazása során így rendkívül gyorsan megbízható eredményt kapunk az újonnan azonosított *P. acnes* izolátumokról, felbontása és specificitása széleskörű.

4.3 eMLST (expanded Multilocus Sequence Typing)

Munkacsoportunk részt vett a 7 háztartási gén részleges szekvenciájának felhasználásával kialakított eMLST kidolgozásában [4]. Mivel számos *P. acnes* törzs [1,14,15,16] teljes genom szekvenciája rendelkezésünkre állt, ezért a felbontás további növelése érdekében finomítottuk a módszert. Ennek során a *recA* háztartási gén kikerült a vizsgált gének közül, viszont 2 feltételezett virulencia gén, a hemolizin (*tly*) és a Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) faktor homológ (*camp2*), nukleotid szekvenciáját bevettük a vizsgált allélek közé.



3. Ábra. Az eMLST során vizsgált 8 gén fragmentum mintázata

Az eMLST során meghatározott 8 allél (3. Ábra) kombinációjával megállapítható az e-szekvencia típus (eST). Ily módon az előzőleg multiplex PCR módszerrel tipizált izolátumainkról még pontosabb képet kaphatunk a filogenetikai csoportjukon belüli hovatartozásukról. A 4. Táblázatban foglaltuk össze a kiválasztott izolátumaink RAPD, MLST és eMLST adatait.

4. Táblázat. Összesítő táblázat a megjelölt izolátumok RAPD, MLST és eMLST adataival. A három módszer közül az eMLST képes a legjobb felbontásra, amely segítségével immáron >110 allélkombinációt (eST-t) sikerült azonosítanunk.

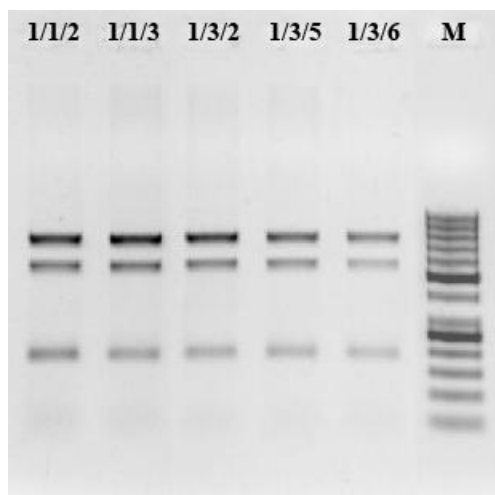
Izolátum	RAPD profil	Szekvencia típus - MLST	MLST filotípus	Szekvencia típus - eMLST	eMLST filotípus
6609	I	ST-10	IB	eST-5	IB
51318	I	ST-10	IB	eST-5	IB
887674	I	ST-10	IB	eST-5	IB
PRP-60	I	ST-6	IA	eST-20	IA ₁
157256	I	ST-6	IA	eST-3	IA ₁
317669	I	ST-6	IA	eST-1	IA ₁
226	I	ST-6	IA	eST-31	IA ₁
434	I	ST-25	IA	eST-20	IA ₁
P.acn 31	I	ST-27	IA	eST-36	IA ₂
P.acn 33	I	ST-9	IA	eST-2	IA ₂
P.acn 17	I	ST-22	IA	eST-22	IA ₂
PRP-38	I	ST-29	IC	eST-70	IC
ATCC 11828	II	ST-44	II	eST-27	II
PRP-47	II	ST-40	II	eST-28	II
Asn12	III	ST-19	III	eST-33	III
12S	III	ST-30	III	eST-81	III

Az általunk kialakított eMLST módszer tehát 6 háztartási gén részleges és 2 feltételezett virulencia gén teljes nukleotid szekvencia analízisén alapul. Az eMLST az eredeti MLST-hez képest jelentősen megnövelt felbontást biztosít: immáron 6 filogenetikai csoportra képes osztani az izolátumokat, úgy mint IA₁, IA₂, IB, IC, II és III. További jelentősége az eMLST-nek, hogy a filogenetikai csoportok immáron a betegségeket is jól reprezentálják: az IA₁ és IC csoportba sorolt izolátumok elsősorban aknés bőrről származnak, az IA₂ izolátumokat aknéből és szemfertőzésekben izoláltuk, az IB csoportba tartozók pedig nagy valószínűséggel a kommenzalisták.

4.4 Klinikai minták tipizálása

A klinikai mintagyűjtés során az aknés betegek arcáról egy úgynevezett törlést készítenek, majd ebből szemi-szelektív táptalajon kerül kitenyésztésre a *P. acnes*. Könnyen belátható, hogy ily módon ebbe a tenyésztésbe az opportunistáknak át a normál flóra tagjai, vagyis a kommenzalisták is bekerülhetnek: ez a veszéllyel fenyeget, hogy egy-egy ártalmatlan törzset patogénnek tipizálnak. Annak érdekében, hogy a potenciálisan patogén törzseket pontosan elkülönítsük és a későbbiekben ezek molekuláris jellemzésével

gyógyszercélpontokat azonosítsunk, a klinikai mintavételezést is finomítottuk. A nantesi Bőrclinika bőrgyógyászai ezért immáron specifikusan az egyes aknés betegek papulláiból, pustuláiból, komedójaiból valamint proximális egészséges bőrfelületről gyűjtötték számunkra a mintákat. Ez a mintavételezés lehetőséget nyújtott számunkra, hogy a *P. acnes* kolonizációjának dinamikáját intra- és interperszonális szinten is vizsgáljuk.



4. Ábra. Egyetlen beteg 1 aknés follikulusából izolált *P. acnes* törzsek multiplex PCR-el való tipizálása

Ezt a mintavételezési stratégiát felhasználva teszteltük azt a feltételezésünket, amely szerint egy adott follikulust azonos filogenetikai csoportba, sőt azonos e-szekvencia típusba (eST) tartozó törzs kolonizál és amennyiben az adott mikrokörnyezetben a patogén törzsek túlnővik a kommenzalistákat, acne vulgaris alakulhat ki. A betegekről származó minták multiplex PCR-es tipizálása igazolta hipotézisünket (4. Ábra): az egyes betegek különböző aknés területeiről ugyan más-más eST-be tartozó *P. acnes* törzseket izoláltunk, azonban az adott follikuluson belül többnyire ugyanabba az eST-be tartozó törzsek találhatók. Néhány esetben ugyan a beteg területekről izolált törzsek között nemcsak a patogénnek számító IA₁, IA₂ és IC típusba tartozó törzseket izoláltunk, hanem elvétve IB típusú törzseket is, azonban ez nagy valószínűséggel a környező egészséges területekről származó kommenzalista „szennyeződés”, amely a mintavételezéskor került a mintába (nem mutatott adatok).

Kísérleti felállásunkban minden egyes follikulusból 8-8 törzset tenyésztettünk ki. Habár a multiplex PCR-el történő gyors tipizálással egyértelműen megállapítottuk az

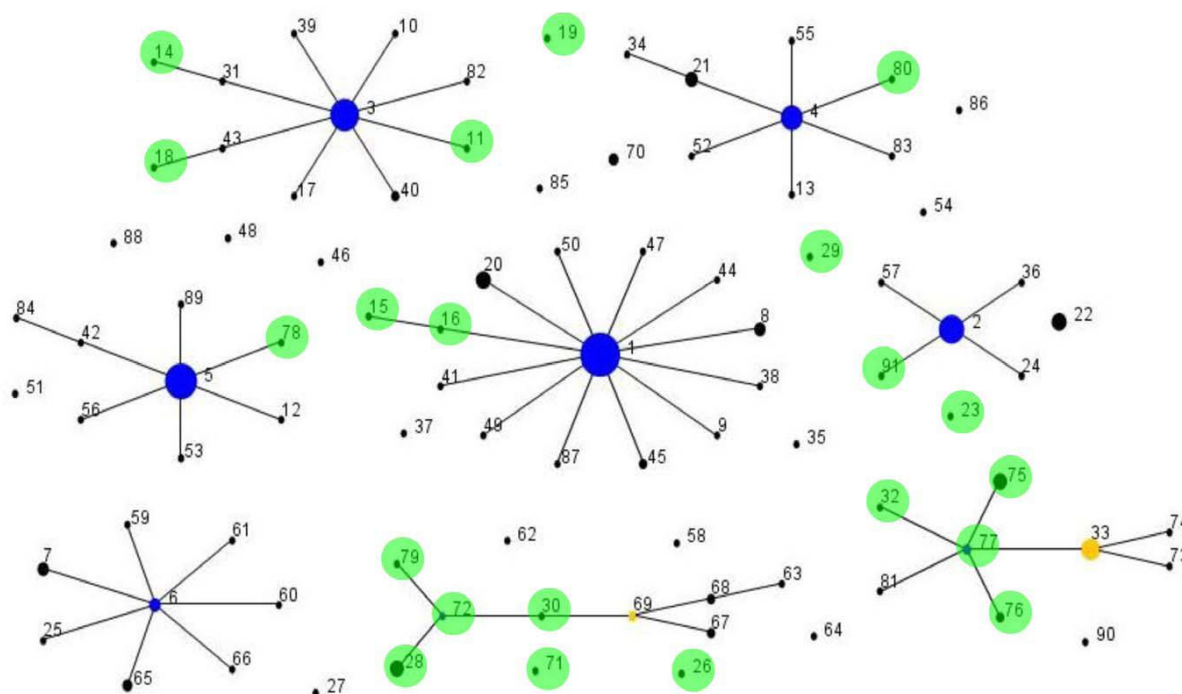
izolátumok típusát, az eMLST felhasználásával tovább finomítottuk a felbontást. A multiplex PCR-es eredményeink alapján azt már tudtuk, hogy az adott follikulusból kitenyésztett izolátumok ugyanabba a filogenetikai típusba tartoznak, ezért a továbbiakban csak 2-2 izolátumnak határoztuk meg az eMLST allél-kombinációját. Megállapítottuk, hogy az adott follikuluson belül az izolátumok ugyanabba a szekvenciatípusba tartoznak. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy egy-egy follikulust kizárólag egyetlen törzs kolonizál. Az 5. Táblázatban összesítettünk 5 acné vulgarisban szenvedő beteg kezelési adatait valamint a kitenyésztett *P. acnes* izolátumok tulajdonságait.

5. Táblázat. Aknés betegek kezelési előzményei valamint a kitenyésztett *P. acnes* izolátumok jellemzése. BPO: benzoil-peroxid

Antibiotikum kezelés az elmúlt 1 évben		Aktuális akne kezelés			Izolálási terület	Izolált törzs	Izolált ST
	igen/nem	topikális/szisztémás	milyen	mióta			
1	nem	szisztémás	Isotretinoin	8 hónap	pusztula	IA ₂	eST-2
					comedo	IA ₂	eST-2
					pusztula	IA ₂	eST-22
					normál	IB	eST-5
2	igen	topikális	BPO	2 hónap	pusztula	IA ₁	eST-3
	szisztémás				papula	IA ₁	eST-1
	(lymecyclin)				pusztula	IA ₁	eST-4
					normál	IB	eST-5
3	nem	szisztémás	Spironolacton	3 hónap	papula	IA ₁	eST-3
					papula	IA ₁	eST-4
					papula	IA ₁	eST-4
					normál	IB	eST-5
4	nem	szisztémás	Isotretinoin	1 hónap	papula	IA ₂	eST-22
					papula	IA ₂	eST-2
					papula	IA ₂	eST-2
					normál	IB	eST-5
5	igen	topikális	BPO	2 hónap	papula	IC	eST-85
	szisztémás				comedo	IC	eST-70
	(lymecyclin)				pusztula	IC	eST-85
					normál	IB	eST-5

4.5 Filogenetika

Az eBURST algoritmus segítségével és az eMLST adatbázis felhasználásával 91 eST-t 8 klonális komplexbe (CC) soroltunk és 21 szingletont (olyan eST-k, amelyet jelenleg csak egyetlen izolátum képez) különítettünk el. Az egyes klonális komplexeken belül az eST-k legalább 7/8 közös alléllal rendelkeznek egy másik eST-vel. Az IA₁ izolátumokat a CC1, CC3 és CC4 klonális komplexek és 11 szingletont, az IA₂ izolátumokat a CC2 klonális komplex és 2 szingletont, az IB izolátumokat a CC5 klonális komplex és 1 szingletont, a II-es típusú izolátumokat a CC6, CC69 klonális komplexek és 6 szingletont, a III-as izolátumokat pedig a CC77 klonális komplex és 1 szingletont képviseli (5. Ábra) [1].



5. Ábra. Az eMLST adatbázis 91 eST eBURST analízise.

Az egyes eST-k gyakoriságát a karikák területe jelzi. Kék: alapító genotípusok, sárga: sub-alapító genotípusok, zöld: egészséges bóról izolált eST-k.

Az eBURST eredményei és a nagy felbontású eMLST tipizálási módszer lehetővé tette számunkra, hogy az eST-k alapján fejlődéstörténeti analízist hajtsunk végre, amelynek eredményeként egy filogenetikai fát kapunk. Az izolátumok 3 fő kládba oszthatók fel a tly és CAMP factor gén szekvenciák alapján, ami arra utal, hogy ezek a faktorok együtt fejlődtek a háztartási génekkel: ez a 3 klád a fő genetikai divízióknak (I, II és III) felel meg. Az I-es kládon belül az IA típusú törzsektől genetikai távolság szempontjából jól elkülönülő csoportot

hoznak létre az IB típusú eST-ket képviselő izolátumok. Az IA típusú izolátumokat 2 nagyon eltérő csoportba sorolták, amik az IA₁ és IA₂ típusoknak felelnek meg. Az IA₁ izolátumok 3 csoportba különíthetők el, amelyek a CC1, CC3 és CC4 klonális komplexeknek felelnek meg. Az I-es kládon belül továbbá az IC típusú izolátumokat is elkülönítettük, amelyek az eBURST felvételen még az IA₁ osztályon belül helyezkedtek el (6. Ábra).



6. Ábra. 91 *P. acnes* eST-jéből összeillesztett gén szekvenciák minimum evolúciós filogenetikai fája.

A fa karjain a lefedettség értékek láthatóak, a vízszintes sávok hossza a genetikai távolságot jelzik, a függőleges színes sávok az eBURST alapján létrehozott klonális komplexeket jelölik. A színek kódok és a hozzájuk tartozó eBURST csoportok valamint a szingletonok a bekeretezett részben vannak feltüntetve.

Az aknés izolátumok jelentős része az IA₁ típus CC1, CC3 és CC4 klonális komplexeibe sorolható, és leggyakrabban az eST1 szekvencia típusba tartoznak. Azonban további klinikai állapotok esetén is izolálták ezt az e-szekvencia típust pl. fogászati és szemészeti gyulladások esetén, ami bizonyítékot nyújt arra, hogy a leágazás patogén profilja nem csak az aknéra korlátozódik. Az aknés izolátumokat kisebb arányban az eST3 és eST4 szekvencia típusok is képviselik. Az egészséges bőrről származó izolátumok nagy része az IB típus CC5, a II-es típus CC72 és III-as típus CC77 klonális komplexek tagjai, és kisebb hányadában orvosi implantátumokkal kapcsolatos fertőzésekkel is összefüggésbe hozhatók [1].

4.6 Antibiotikum érzékenység

A gyógyászatban széleskörűen alkalmazott antibiotikumok hatása általánosságban véve is gyengülni látszik és igaz ez a *P. acnes*-el szemben is. Az antibiotikumok nemcsak túlzott, de helytelen alkalmazása során egyre több antibiotikum rezisztens törzs jelenik meg. Egyre több tanulmány taglalja, hogy a patogén baktériumok szaporodását célzott terápiával képesek lehetünk meggátolni, ezzel párhuzamosan megőrizve és fenntartva a bőrünkön élő kommenzalista mikroflórát. Feltételezéseink szerint ez nagy valószínűséggel igaz lehet a *P. acnes* esetében is, ezért antibiotikum érzékenységi teszteket végeztünk ennek igazolására. Jelen dolgozatban az IA₁ valamint az IC típusokba tartozó izolátumokra fókuszáltunk, mivel ez a két filogenetikai csoport hozható összefüggésbe az acne vulgarissal.

A 6. Táblázat az IA₁ típusú PRP-60 törzs antibiotikum érzékenységi eredményeit tartalmazza. Az adott törzs az erytromycin minden alkalmazott koncentrációjára rezisztens volt; a tetracyclin esetén az 1 µg/ml koncentrációtól kezdődően a *P. acnes* nem növekedett, míg a moxifloxacin esetében már 0,125 µg/ml esetén részleges feltisztulási zónát tapasztaltunk, magasabb koncentrációnál pedig teljes feltisztulási zóna jelent meg.

6. Táblázat. Az IA₁ típusba tartozó PRP-60-as törzs érzékenységi küszöbe a különböző antibiotikumok esetében

	Erytromycin	Tetracyclin	Moxifloxacin
0,06 µg/ml	+	+	+
0,125 µg/ml	+	+	(+)
0,25 µg/ml	+	+	-
0,5 µg/ml	+	+	-
1 µg/ml	+	-	-
10 µg/ml	+	-	-

A szintén IA₁ típusú 226 (7. Táblázat) valamint 434 (8. Táblázat) törzsek növekedését az erytromycin és a moxifloxacin kezelés esetén is a 0,25 µg/ml-től kezdődő koncentrációk gátolták, míg a tetracyclines kezelés során a gátlási zóna megjelenése a 1 µg/ml koncentrációtól kezdődően volt észlelhető.

7. Táblázat. Az IA₁ típusba tartozó 226-os törzs érzékenységi küszöbe a különböző antibiotikumok esetében

	Erytromycin	Tetracyclin	Moxifloxacin
0,06 µg/ml	+	+	+
0,125 µg/ml	+	+	+
0,25 µg/ml	-	+	-
0,5 µg/ml	-	+	-
1 µg/ml	-	-	-
10 µg/ml	-	-	-

8. Táblázat. Az IA₁ típusba tartozó 434-es törzs érzékenységi küszöbe a különböző antibiotikumok esetében

	Erytromycin	Tetracyclin	Moxifloxacin
0,06 µg/ml	+	+	+
0,125 µg/ml	+	+	+
0,25 µg/ml	-	+	-
0,5 µg/ml	-	+	-
1 µg/ml	-	-	-
10 µg/ml	-	-	-

A 4.4 fejezetben bemutattuk egy 14 éves kislányról származó adatokat (5. táblázat): az akne kialakulása után 1 évnyi szisztémás lymecyclin kezelés után történt mintavételezés során az IC típusba tartozó *P. acnes* törzseket tenyésztettünk ki. Mivel a lymecyclint viszonylag rövid ideje alkalmazzák az akne kezelésére, továbbá eddig mindössze három különböző IC típusú törzsről volt tudomásunk ezért kíváncsiak voltunk, hogy a kislányról izolált két IC típusú törzs vajon lymecyclin rezisztens-e. Mivel a lymecyclin egy tetracyclin származék, ezért a kísérleteink során kontrollként a tetracyclin rezisztens PRP-60-as valamint a tetracyclin érzékeny III-as típusú 12S törzseket is bevontuk.

9. Táblázat. Az IC típusba tartozó 5/1/3-es és 5/1/5-ös valamint az IA₁ típusba tartozó PRP-60-as és a III-as típusú 12S törzsek érzékenységi küszöbe a lymecyclin esetében

Lymecyclin	5/1/3 és 5/1/5	PRP-60	12S
0,25µg/ml	+	+	+
1µg/ml	+	+	-
5µg/ml	+	+	-
7,5µg/ml	+	+	-
10µg/ml	(+)	+	-
12,5 µg/ml	(+)	+	-
15 µg/ml	(+)	+	-
17,5 µg/ml	(+)	+	-
20 µg/ml	(+)	+	-
22,5 µg/ml	(+)	+	-
25 µg/ml	(+)	+	-
50 µg/ml	-	+	-

Amíg a PRP-60-as törzs a lymecyclin mindegyik alkalmazott koncentrációjára rezisztensnek, a 12S törzs pedig - a legalacsonyabb koncentrációt kivéve - szenzitívnek bizonyult, az 5/1/3 és 5/1/5 törzsek a lymecyclin 0,25-7,5 µg/ml közötti koncentrációjára rezisztensek voltak és csak magasabb dózisban tapasztaltunk részleges (10-25 µg/ml) vagy teljes (50 µg/ml) szenzitivitást (9. Táblázat).

Megállapítottuk tehát, hogy az IA₁ típusba tartozó PRP-60-as törzs erytromycin, tetracyclin és lymecyclin rezisztens valamint hogy a 226-os és 434-es törzsek tetracyclin rezisztensek. Sajnos ezekről a törzsekről nincs részletes izolálási anamnézis, ezért nem tudjuk,

hogy a rezisztencia az adott beteg kezelése következményeként alakult-e ki. Ezzel szemben az IC típusú 5/1/3 és 5/1/5 törzseket szisztémás lymecyclin kezelés után izoláltuk, vagyis valószínűsíthető, hogy a lymecyclin rezisztencia a kezelés hatására alakult ki.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Bőrünkön, szervezetünk első védelmi vonalán nemcsak kommenzalista hanem patogén formában is előforduló *P. acnes* egy Gram-pozitív, coryneform, nem spórázó, anaerob, oportunista baktérium, amelyet számos kórkép megjelenésével hoztak összefüggésbe. Leggyakrabban az acne vulgaris kialakításában játszik szerepet, amely multifaktoriális eredetű betegség és a pilosebaceous follikulusok krónikus gyulladása jellemzi. Elsősorban a serdülőkorúak és fiatal felnőttek körében elterjedt jellegzetesen a sok faggyútermelő miriggyel rendelkező bőrfelületeken, mint pl. az arc, nyak, mellkas, hát vagy váll. A kórkép patogenezise valamint a *P. acnes* pontos szerepe azonban még nem teljesen ismert.

Munkánk során olyan módszereket - pl. touchdown multiplex PCR és eMLST - dolgoztunk ki, amelyekkel a *P. acnes* különböző izolátumai gyorsan, hatékonyan és megbízható módon azonosíthatóak és osztályozhatóak. Az általunk kifejlesztett munkafolyamat - follikulus-specifikus mintavétel, majd a kitenyésztett törzsek multiplex PCR-es valamint eMLST-s jellemzése - immáron nagy megbízhatósággal állapítja meg az adott egyént kolonizáló *P. acnes* patogenitását.

Az akne kezelése az elmúlt évtizedekben, a gyógyászatban széleskörűen alkalmazott különféle antibiotikumokkal történt, azonban hatásuk gyengülni látszik és helytelen alkalmazásuk egyre több rezisztens törzs kialakulását eredményezi, amely világméretű problémát jelent. Számos patogén *P. acnes* izolátum antibiotikum érzékenység meghatározása során megállapítottuk, hogy az antibiotikum rezisztens törzsek elsősorban az IA₁ és IC típusba sorolhatóak: ezek az eredmények ismételt rávilágítottak az eMLST felbontásának specificitására és valószínűsítik, hogy a patogén törzsek az IA₁, IA₂ és IC típusokba tartoznak.

A törzsek filogenetikai csoportokba és szekvencia típusokba való bontása segítségével tehát elkülöníthetőek a kommenzalista valamint a patogén *P. acnes* izolátumok, amelyek teljes genomsekvenciáinak összehasonlításával számos különbséget azonosítottunk: ezek potenciálisan a morfológiai különbségekért, a patogenitásért, az antibiotikum-rezisztenciáért illetve a virulenciáért felelős faktorok.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, et al. (2012) An expanded multilocus sequence typing scheme for *propionibacterium acnes*: investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains. PLoS One 7: e41480.
2. Perry AL, Worthington T, Hilton AC, Lambert PA, Stirling AJ, et al. (2003) Analysis of clinical isolates of *Propionibacterium acnes* by optimised RAPD. FEMS Microbiol Lett 228: 51-55.
3. Nagy I, Kemeny L (2007) Defining the role of epidermal cells in the pathogenesis of inflammatory acne. Current Trends in Immunology 8: 1-9.
4. McDowell A, Gao A, Barnard E, Fink C, Murray PI, et al. (2011) A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes* and characterization of type I cell surface-associated antigens. Microbiology 157: 1990-2003.
5. McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S (2008) A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. J Med Microbiol 57: 218-224.
6. Bojar RA, Holland KT (2004) Acne and *Propionibacterium acnes*. Clin Dermatol 22: 375-379.
7. Pivarcsi A, Nagy I, Kemeny L (2005) Innate Immunity in the Skin: How Keratinocytes Fight Against Pathogens. Current Trends in Immunology I: 29-42.
8. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, et al. (2006) *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. Microbes Infect 8: 2195-2205.
9. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, et al. (2005) Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. J Invest Dermatol 124: 931-938.
10. Kunishima S, Inoue C, Kamiya T, Ozawa K (2001) Presence of *Propionibacterium acnes* in blood components. Transfusion 41: 1126-1129.

11. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
12. Nord CE, Oprica C (2006) Antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes*. Microbiological and clinical aspects. *Anaerobe* 12: 207-210.
13. Oprica C, Emtestam L, Lapins J, Borglund E, Nyberg F, et al. (2004) Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* on the skin of patients with moderate to severe acne in Stockholm. *Anaerobe* 10: 155-164.
14. Horvath B, Hunyadkurti J, Voros A, Fekete C, Urban E, et al. (2012) Genome sequence of *Propionibacterium acnes* type II strain ATCC 11828. *J Bacteriol* 194: 202-203.
15. Hunyadkurti J, Feltoti Z, Horvath B, Nagymihaly M, Voros A, et al. (2011) Complete genome sequence of *Propionibacterium acnes* type IB strain 6609. *J Bacteriol* 193: 4561-4562.
16. Voros A, Horvath B, Hunyadkurti J, McDowell A, Barnard E, et al. (2012) Complete genome sequences of three *Propionibacterium acnes* isolates from the type IA(2) cluster. *J Bacteriol* 194: 1621-1622.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Nagy István témavezetőm és Dr. Gácsér Attila belső konzulensem áldozatos munkáját, mindenre kiterjedő szakmai segítségét, támogatását.

Köszönöm Dr. Kondorosi Évának, az MTA SZBK Biokémiai Intézet Genomikai Egységének vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a kutatótevékenységében való részvételt.

Hunyadkürti Juditnak, Cseklye Juditnak és Vörös Andreának az elméleti és gyakorlati tanácsait és a kísérleteim elvégzéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket köszönöm.

Köszönöm Andrew McDowell-nek (Belfast, Nagy-Britannia) a multiplex PCR és az eMLST módszerek kifejlesztésében nyújtott segítségét, valamint Brigitte Dreno-nak (Nantes, Franciaország) a klinikai mintavételezést.

8. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ

Alulírott Magyarai Márta a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- feltüntetett összes *P. acnes* és *P. avidum* törzs tenyésztését,
- nukleinsav izolálást,
- RAPD analízist,
- Multiplex PCR reakciót,
- eMLST analízist,
- antibiotikum érzékenységi tesztek

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2012. november 5.