

Porovnávací studie výsledků léčby akné vakcínami a systémovými antibiotiky

2. Charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných z ložisek akné a jejich rezistence na antibiotika

Lovečková Y.¹, Koukalová D.¹, Viktorinová M.², Sauer P.¹, Síla J.¹

¹Ústav mikrobiologie LF UP a FN Olomouc, přednostka doc. MUDr. D. Koukalová, CSc.

²Klinika chorob kožních a pohlavních LF UP a FN Olomouc, přednostka doc. MUDr. D. Ditrichová, CSc.

Souhrn

Porovnávací studie výsledků léčby akné vakcínami a systémovými antibiotiky. 2. Charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných z ložisek akné a jejich rezistence na antibiotika

Auři popisují stav a vlastnosti kožní mikroflóry u 51 pacientů s akné v závislosti na léčbě vakcínou nebo antibiotiky. Dále ověřují genetickou shodu u fenotypově stejných izolátů získaných od jednoho pacienta při opakovaných odběrech. U druhu *Staphylococcus aureus* pak stanovují vybrané faktory virulence.

Práce potvrdila spoluúčast stafylokoků a propionibakterií v etiopatogenezi akné, dokumentovala i jejich statisticky nevýznamné ovlivnění oběma způsoby léčby. Testy citlivosti prokázaly jen nízkou rezistenci *Propionibacterium acnes* na klindamycin (6,7 %), která však byla vyšší u druhu *Staphylococcus epidermidis* (na erytromycin 73,4 %, klindamycin 62,6 %). V průběhu sledování nebyly prokázány její významné změny.

Fenotypově shodné kmeny koaguláza-negativních stafylokoků byly nalezeny u 12 pacientů. Analýzou elektroforetických profilů jejich DNA byla zjištěna genetická shoda u 6 (50 %) klinických případů. Detekce faktorů virulence u *Staphylococcus aureus* prokázala přítomnost genu pro tvorbu Pantanova-Valentino-va leukocidinu u třech kmenů. Geny pro enterotoxin A a TSST-1 nebyly nalezeny.

Klíčová slova: akné – *Propionibacterium acnes* – *Staphylococcus sp.* – rezistence na antibiotika – faktory virulence

Summary

Comparative Study of Acne Treatment with Vaccines and Systemic Antibiotics. Part 2: Characteristics of Bacterial Strains Isolated from Acne Lesions and their Antibiotic Resistance

Authors characterized skin microflora in 51 patients with acne after treatment either with vaccine or antibiotics. They also verified genetic homology of phenotypically identical isolates repetitively taken from the same patient and determined selected virulence factors in *Staphylococcus aureus* species.

Study confirmed participation of staphylococci and propionibacteriae in etiopathogenesis of acne and documented statistically not significant influence of both treatment modalities on the above mentioned pathogens. Sensitivity tests confirmed only low resistance of *Propionibacterium acnes* to klindamycin (6.7%) and higher resistance of *Staphylococcus epidermidis* species (73.4% to erythromycin and 62.2% to klindamycin). Significant resistance changes were not demonstrated during study.

Identical phenotype of coagulase negative staphylococci strains was found in 12 patients. Electrophoretic DNA profile analysis revealed genetic homology in 6 (50%) cases. Virulence factors detection demon-

Tato dílčí studie byla finančně podporována grantem IGA MZ ČR č. NR9065-3/2006 a MSM 6198959223

Pozn. 1. část této práce: „Porovnávací studie výsledků léčby akné vakcínami a systémovými antibiotiky. 1. Hodnocení léčebného účinku.“ byla publikována v č. 4 Čes.-slov Derm 2005.

strated presence of gene for Panton-Valentine leukocidine synthesis in 3 *Staphylococcus aureus* strains. No enterotoxin A and TSST-1 genes were found.

Key words: acne – *Propionibacterium acnes* – *Staphylococcus sp.* – antibiotic resistance – factors of virulence

ÚVOD

Acne vulgaris je chronické zánětlivé onemocnění pilosebaceózní jednotky s různým podílem jednotlivých patogenetických faktorů a variabilitou klinických forem. V patogenezi má nesporný význam i přirozená kožní mikroflóra, zejména *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), v menší míře i další druhy propionibakterií. Vykazují celou řadu enzymatických aktivit – jejich lipázy štěpí diacylglyceroly a triacylglyceroly mazu na glycerol a volné mastné kyseliny, které indukují proliferaci hyperkeratózu folikulárního vývodu a působí tak komedogenně. Svým iritačním účinkem (pokles pH) vedou k narušení až ruptuře mazové žlázy. Obdobně proteázy umožňují průnik obsahu folikulu jeho stěnou a hyaluronidázy podporují šíření zánětu v dermis. Klinickým důsledkem je vznik primárních nezánnětlivých mikrokomedonů a uzavřených nebo otevřených komedonů, posléze i sekundárních zánětlivých projevů – papul, pustul, indurací i abscesů (6, 15).

Propionibakteria ovlivňují buněčné i humorální složky imunitního systému – dochází ke zvýšení interleukinu-1 α , chemotaktických faktorů a aktivaci komplementu. Ve srovnání se zdravými mají pacienti s akné signifikantně větší počet a intenzitu časně i pozdní odpovědi na antigeny *P. acnes*. Kromě dalších enzymů (fosfatáz, neuraminidáz, deoxyribonukleáz) produkují látky blízké prostaglandinům, které se také uplatňují při vzniku zánětlivých projevů akné (4, 13, 17).

Ostatní bakterie kožní mikroflóry, zejména *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), mohou rovněž produkovat uvedené enzymy a uplatnit se tak v etiopatogenezi akné. Význam druhu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) při hnisavých projevech je nesporný (1, 5, 15, 16).

Cílem práce bylo posoudit ovlivnění kožní mikroflóry aknézních lézí léčbou vakcínou nebo antibiotiky (ATB), včetně případného nárůstu rezistence vypěstovaných kmenů k ATB, dále ověřit shodu fenotypově stejných izolátů od jednoho pacienta pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) a stanovit tak jejich perzistenci nebo naopak kolonizaci novým kmenem. V případě nálezů *S. aureus* bylo cílem detekovat geny vybraných faktorů virulence.

METODIKA

V období čtyř let bylo sledováno 51 pacientů s těžšími formami akné, u nichž byla k léčbě použita tetracyklinová ATB (17 pacientů) nebo lyofilizovaná vakcína v kaps-

lích (34 pacientů). Charakteristika obou souborů pacientů, způsoby léčby a hodnocení jejich výsledků jsou publikovány v 1. části této studie (14).

U obou skupin pacientů byla indikována kultivační vyšetření hnisu z aknézních eflorescencí před zahájením léčby a následně za 6 týdnů po jejím zahájení, dále po ukončení léčby ATB nebo za 6 měsíců od začátku vakcínoterapie. Z technických důvodů nebyla provedena všechna tři vyšetření od všech pacientů, tato skutečnost je zohledněna ve výsledcích i statistickém hodnocení.

Odběry materiálu k vyšetření byly provedeny na ambulanci mikrobiologického pracoviště s bezprostřední inokulací na půdy pro aerobní i anaerobní kultivaci.

U vypěstovaných kmenů byla provedena druhová identifikace pomocí testů – STAPHYtest 16, Staphaurex Plus, ANAEROTest 23 a API A. Antibiogram se prováděl u izolátů *P. acnes* difúzní agarovou metodou, stafylokoky byly testovány standardní diluční mikrometodou se stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC). U stafylokoků byla zjišťována citlivost na penicilin (PEN), oxacilin (OXA), erytromycin (ERY), chloramfenikol (CMP), tetracyklin (TET), klindamycin (CLI) a kotrimoxazol (KOT), u propionibakterií na PEN, amoxicilin + sulbaktam (AMS), cefoxitin (CXT), CMP, CLI a metronidazol (MRT).

Vybrané dvojice (někdy i trojice) fenotypově shodných kmenů téhož druhu, izolované od jednoho pacienta před zahájením léčby a v jejím průběhu nebo po ukončení, byly štěpené restriktázou SmaI nebo endonukleázou XbaI a poté porovnány pomocí PFGE. U izolátů *S. aureus* byly detekovány technikou PCR geny faktorů virulence – Pantonův-Valentinův leukocidin, enterotoxin A a TSST-1 (toxin syndromu toxického šoku), za použití pozitivních kontrol (č. NRL 05/25, 03/96, 03/171), získaných od dr. P. Petráše (Národní referenční laboratoř pro stafylokoky, SZÚ v Praze).

Výsledky byly zpracovány statisticky χ^2 -testem a testem nerovnosti podílů.

VÝSLEDKY

Ve výsledcích obou souborů pacientů léčených vakcínou nebo ATB a ve všech časových intervalech odběrů dominovaly koaguláza-negativní stafylokoky (KNS) a propionibakteria. Méně často byl vykultivován *S. aureus* a zcela ojediněle jiné bakteriální druhy. Celkem bylo provedeno 125 vyšetření se záchytem 114 (91,2 %) KNS, 94 (78,4 %) propionibakterií a 13 (10,4 %) kmenů *S. aureus* (tab. 1). Přitom u většiny pacientů bylo deteko-

Tab. 1. Výsledky kultivací ze 125 vyšetření u 51 pacientů s akné

Kultivace	Pozitivní	%
Propionibakteria ¹⁾	98	78,4
<i>Propionibacterium acnes</i>	90	72,0
Koaguláza-negativní stafylokoky ²⁾	114	91,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	91	72,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	10,4
Grampozitivní bakterie ³⁾	12	9,6
Gramnegativní bakterie ⁴⁾	6	4,8

Pozn. U většiny pacientů bylo zachyceno současně více bakteriálních kmenů

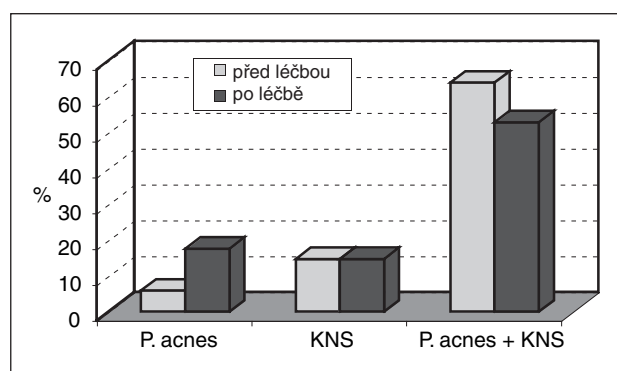
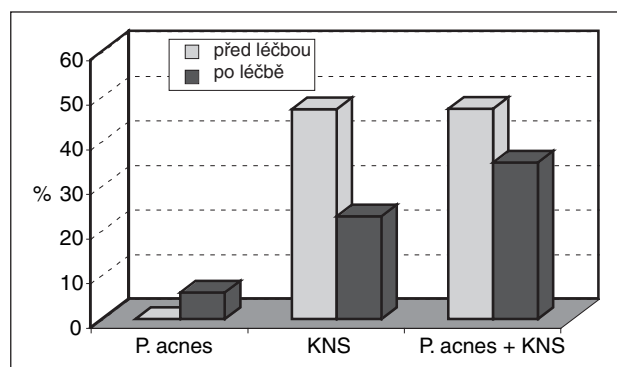
¹⁾*Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium propionicum*

²⁾*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus warneri/pasteurii*

³⁾*Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Peptococcus* sp.

⁴⁾*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*

váno více bakteriálních druhů současně. Nejčastěji izolovaným druhem propionibakterií bylo v 90 případech *P. acnes*, z toho 68 u vakcinovaných a 22 u pacientů léčených ATB, výjimečně byly určeny jiné druhy. Mezi KNS dominoval *S. epidermidis* (91 kmenů), 65 u vakcinovaných a 26 u pacientů léčených ATB, ojediněle byly zachyceny jiné druhy.

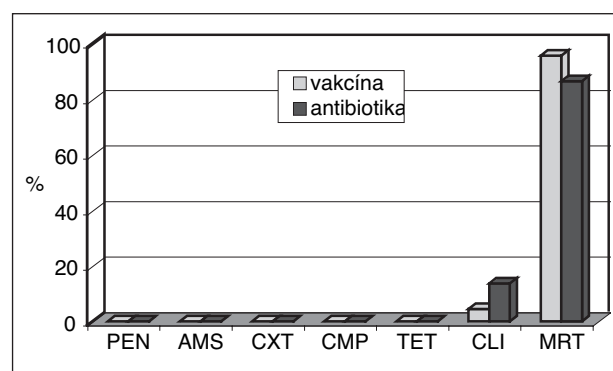
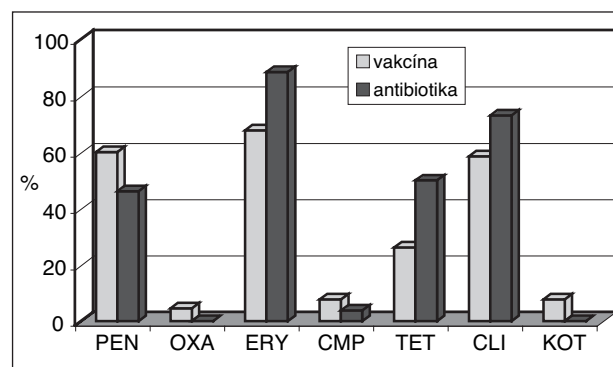
**Obr. 1. Výsledky kultivací v souboru pacientů léčených vakcínou.****Obr. 2. Výsledky kultivací v souboru pacientů léčených antibiotiky.**

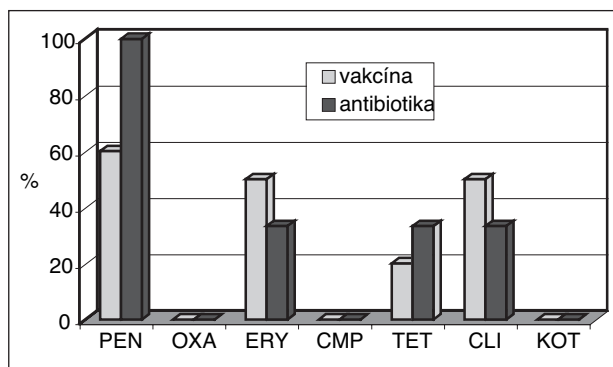
Výsledky kulturačních vyšetření před zahájením obou způsobů terapie, dále v průběhu léčby vakcínou nebo po ukončení aplikace tetracyklinových ATB, jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Před zahájením léčby činila izolace samotných KNS u vakcinovaných 14,7 %, při dalším odběru rovněž 14,7 %. Ve skupině pacientů léčených ATB to bylo 47 % před léčbou a 23 % po ní. Rod *Propionibacterium* byl samostatně detekován v 5,9 % před vakcinací a v 17,6 % v jejím průběhu; před antibioterapií nebyl samostatně zachycen, po ní v 5,9 %. Nejčastější výsledek představovala současná izolace KNS a propionibakterií. Před léčbou vakcínou nebo ATB byl nález obou druhů popsán v 64 % nebo 47,1 %, po jejím ukončení v 52,9 % nebo 35,3 %.

Ze všech odběrů bylo identifikováno jen 13 kmenů *S. aureus*, 10 (11,1 %) od vakcinovaných pacientů a 3 (7,9 %) od léčených ATB (ze všech vyšetření provedených v této skupině). V žádném případě se nejednalo o opakovaný záchyt u jednoho pacienta.

Statistickým zpracováním nebyl prokázán významný rozdíl ve frekvenci nálezů jednotlivých bakterií v uvedených časových intervalech u žádné skupiny léčených.

Antibiogramy *P. acnes* celkem vykazovaly rezistenci k metronidazolu (93,3 %) a klindamycinu (6,7 %). U vakcinovaných šlo o 95,6 % rezistentních kmenů k metroni-

**Obr. 3. Porovnání rezistence *Propionibacterium acnes* na testovaná antibiotika v souborech pacientů léčených vakcínou a systémovými antibiotiky.****Obr. 4. Porovnání rezistence *Staphylococcus epidermidis* na testovaná antibiotika v souborech pacientů léčených vakcínou a systémovými antibiotiky.**



Obr. 5. Porovnání rezistence *Staphylococcus aureus* na testovaná antibiotika v souborech pacientů léčených vakcínou a systémovými antibiotiky.

dazolu a 4,4 % ke klindamycinu. Ve skupině léčených ATB činil podíl izolátů rezistentních k metronidazolu 86,4 % a ke klindamycinu 13,6 %. K ostatním testovaným antibakteriálním přípravkům byla zjištěna naprostá citlivost (ve 100 %) (obr. 3).

V případě *S. epidermidis* (obr. 4) se vyskytla 73,4% rezistence k erytromycinu (z toho 67,7 % u vakcinovaných a 88,5 % u léčených ATB), 62,6% ke klindamycinu (58,5 % u vakcinovaných a 73,1 % u léčených ATB), 56% k penicilinu (60 a 46,2 %), 33% k tetracyklinu (26,2 a 50 %). Ze 13 kmenů *S. aureus* (obr. 5) byla zjištěna rezistence k penicilinu v 69,2 %, k erytromycinu a klindamycinu ve 46,2 %, k tetracyklinu ve 23,1 %. Statisticky významný nárůst rezistence během léčby vakcínou nebo ATB pozorován nebyl.

Fenotypově shodné kmeny KNS byly nalezeny u 12 pacientů v obou skupinách (sedmkrát u vakcinovaných, pětkrát u pacientů léčených ATB). Analýzou elektroforetických profilů jejich DNA, štěpené restriktázou SmaI, byla zjištěna genetická shoda u 6 (50 %) klinických případů, z toho pětkrát šlo o izoláty ve skupině vakcinovaných pacientů. Druhově stejné kmeny KNS, u nichž nebyla zjištěna fenotypová shoda, byly s časovým odstupem opakovaně zaznamenány u 14 vakcinovaných osob a u 7 s antibiotickou léčbou.

U propionibakterií nebylo možné porovnání fenotypově shodných kmenů opakovaně zachycených od jednoho pacienta (7 případů ve skupině vakcinovaných, 2 u léčených ATB) z důvodu nehodnotitelných výsledků při použití SmaI nebo endonukleázy XbaI. Vzniklé fragmenty byly příliš malé a těžko rozlišitelné. Stejně druhy propionibakterií bez fenotypové shody byly opakovaně zachyceny celkem u 18 nemocných léčených vakcínou a 3 s antibiotikou.

Analýza faktorů virulence *S. aureus* prokázala přítomnost genu pro produkci Pantanova-Valentinova leukocidinu ve 3 případech (dvakrát izolace před léčbou, jednou v jejím průběhu). Pacienti s takovým nálezem měli klinicky závažnou formu onemocnění a byli léčeni vakcínou s velmi dobrým terapeutickým efektem. Geny pro enterotoxin A a TSST-1 nebyly detekovány.

DISKUSE

Výsledky kultivačních vyšetření jsou v souladu s našimi dříve publikovanými výsledky v souboru 470 pacientů s různými klinickými formami akné (13). Práce potvrdila spoluúčast stafylokoků a propionibakterií v etiopatogenezi akné, dokumentovala i jejich statisticky nevýznamné ovlivnění při léčbě vakcínou a ATB. V obou souborech byl záchyt samotného *P. acnes* častější po léčbě ATB i vakcínou. Zatímco v průběhu vakcinoterapie zůstala četnost izolace KNS stejná, po léčbě ATB došlo k jejímu poklesu na polovinu. Při současném výskytu *P. acnes* a KNS došlo v souboru léčených ATB k jejich výraznějšímu snížení než při vakcinoterapii.

Mikrobiologické výsledky před léčbou, v jejím průběhu a po ní tak naznačují pokles zachycených kmenů KNS a propionibakterií ve skupině pacientů léčených ATB, u vakcinovaných mírnou redukcí současně izolovaných propionibakterií a KNS. Tyto menší rozdíly podporují známé skutečnosti vyplývající z obou principů léčby. Od aplikace vakcíny není očekáván úbytek bakterií, nýbrž nespecifický imunomodulační efekt (14). Používaná ATB mají bakteriostatický účinek zasahující do proteosyntézy bakterií a tímto způsobem snižují především produkci lipolytických enzymů (3, 11, 17).

V rozporu s klinickými studiemi, včetně multicentrických, z různých zemí světa (2, 3, 10) byla v naší studii prokázána jen nízká rezistence propionibakterií na klindamycin. Podobné zkušenosti prezentují slovenští autoři, kteří ji spolu s erytromycinem uvádějí jen u jednoho z 20 kmenů *P. acnes* (12). Příčinou této nízké rezistence by mohla být skutečnost, že v ČR a na Slovensku není zvykem léčit akné celkově erytromycinem, klindamycin se pak používá jen zřídka a krátkodobě u těžkých zánětlivých forem onemocnění. Avšak erytromycin i klindamycin jsou aplikovány velmi často k lokální léčbě mírnějších forem akné. Široké používání lokálních přípravků s erytromycinem a klindamycinem v léčbě akné způsobilo rozšíření zkříženě rezistentních kmenů propionibakterií po celé Evropě (2, 10). Přitom bylo zjištěno, že rozvoj rezistence většinou dobře koreluje s předchozí léčbou lokálními nebo systémovými ATB. Dvojitě slepá, placebem kontrolovaná studie v souboru 208 pacientů s akné prokázala také vzestup rezistence KNS z 87 na 98 % po 3měsíční léčbě lokálním erytromycinem (8).

V hodnocení antibiogramů stojí také za zmínku relativně nižší rezistence *S. epidermidis* k penicilinu (56 %) v porovnání s jinými hospitalizovanými pacienty FN Olomouc. Mohlo by to souviset s věkem pacientů trpících akné, kteří jinak nebývají často nemocní, a proto jsou jen zřídka léčeni ATB. Poměrně vysoký nález rezistentních kmenů *S. epidermidis* v obou léčených souborech k erytromycinu (73,4 %) a klindamycinu (62,6 %) by mohl být vysvětlen častou lokální aplikací těchto ATB u pacientů s akné. Rozdílné je dále zastoupení kmenů rezistentních k tetracyklinu ve skupině léčených vakcínou (26,2 %) a ATB (50 %).

Z výsledků genetických metod patřila k zajímavějším nálezům detekce Pantonova-Valentinova leukocidinu u 3 kmenů *S. aureus*. Vzhledem k tomu, že pocházely od pacientů s abscedující formou akné, je vysoce pravděpodobné, že se etiologicky podílely na rozvoji těžších forem onemocnění (7, 9).

Úskalí předložené práce spočívá v malých souborech pacientů s akné (34 vakcinovaných a 17 s antibioterapií), kteří splňovali kritéria pro zařazení do této studie. Souvisí to zřejmě s tím, že naprostou většinu nemocných s akné ošetřují ambulantní dermatologové a na kliniku přicházejí obvykle jen pacienti, kteří nereagují na běžnou lokální nebo systémovou léčbu. I když kmeny izolované od nemocných s různými způsoby terapie vykazovaly rozdíly v dílčích výsledcích, jejich statistická významnost nebyla prokázána.

ZÁVĚR

Práce potvrdila účast propionibakterií a stafylokoků v etiopatogenezi akné. Pokles jejich četnosti vlivem obou způsobů léčby nebyl statisticky významný. Testy citlivosti prokázaly jen nízkou rezistenci *Propionibacterium acnes* na klindamycin (6,7 %), která však byla vyšší u druhu *Staphylococcus epidermidis* (na erytromycin 73,4 %, klindamycin 62,6 %). V průběhu sledování nebyly prokázány její významné změny. Genetická shoda u fenotypově stejných kmenů KNS byla prokázána u 6 (50 %) klinických případů. Gen pro produkci Pantonova-Valentinova leukocidinu byl detekován u 3 kmenů *S. aureus* izolovaných od různých pacientů s těžším průběhem onemocnění.

LITERATURA

1. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996, p. 292–293.
2. COATES, P., VYAKRNAM, S., EADY, EA., et al. Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. *Br J Dermatol*, 2002, 146, p. 840–848.
3. EADY, EA. Bacterial resistance in acne. *Dermatology*, 1998, 196, p. 59–66.
4. CHU, T., MUNN, S., BASARAB, T. *Current issues in dermatology. Acne*. London: Maxim Medical, 1996, p. 1–57.
5. KOUKALOVÁ, D., VIKTORINOVÁ, M. Perorální vakcinoterapie v dermatologii. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 1995, 44(1), s. 36–43.
6. LEYDEN, JJ. New understanding of the pathogenesis of acne. *J Am Acad Dermatol*, 1995, 32, p. 15–25.
7. MACHOVÁ, I., PETRÁŠ, P. První potvrzení přítomnosti genů kódujících Pantonův-Valentinův leukocidin u českých kmenů *Staphylococcus aureus*. *Zprávy CEM*, 2004, 13(9), s. 387–388.
8. MILLS, OJR., THORNSBERRY, C., CARDIN, CW., et al. Bacterial resistance and therapeutic outcome following three months of topical acne therapy with 2% erythromycin gel versus its vehicle. *Acta Derm Venereol*, 2002, 82(4), p. 260–265.
9. NOLTE, O., HAAG, H., ZIMMERMAN, A., et al. *Staphylococcus aureus* positive for Pantone-Valentine leukocidin genes but susceptible to methicillin in patients with furuncles. *Eur J Clin Microbiol*, 2005, 24, p. 477–479.
10. ROSS, JI., SNELLING AM., CARNEGIE, E., et al. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol*, 2003, 148, p. 467–478.
11. RULCOVÁ, J. Akné – terapeutické možnosti. *Trendy v Med*, 2001/02 3(3), s. 3–7.
12. SLOBODNÍKOVÁ, L., RASOCHOVÁ E., KOŠTÁLOVÁ D., et al. Bakteriálne osídlení kožných lézií pacientov s akne a jeho citlivosť in vitro na štandardizovaný extrakt z *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Čs Derm*, 2000, 75(3), s. 99–103.
13. VIKTORINOVÁ, M., KOUKALOVÁ, D. Kožní testy s mikrobiálními antigeny. Akné. *Čs Derm*, 1992, 67(3), s. 140–149.
14. VIKTORINOVÁ, M., KOUKALOVÁ, D., KARLOVÁ, I., LOVEČKOVÁ, Y., et al. Porovnávací studie výsledků léčby akné vakcínami a systémovými antibiotiky. 1. Hodnocení léčebného účinku. *Čes.-slov Derm*, 2005, 80(4), s. 224–228.
15. VOHRADNÍKOVÁ, O. Acne vulgaris – klinické varianty, diferenciální diagnostika a možnosti terapie. *Čs Derm*, 1998, Tematická příloha 8 s.
16. VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003 s. 99–109.
17. WEBSTER, G. F. Acne vulgaris – state of the science. *Arch Dermatol*, 1999, 135, p. 1101–1102.

Došlo do redakce: 6. 12. 2006

MUDr. Yvona Lovečková
 Ústav mikrobiologie LF UP a FN Olomouc
 Hněvotínská 3
 775 15 Olomouc
 E-mail: yvona.loveckova@fnol.cz