Akne Vulgarisli Hastalardan Üretilen *Cutibacterium acnes* İzolatlarının Filotiplendirilmesi ve Antimikrobiyallere Duyarlılık Durumlarının Belirlenmesi

Phylotyping and Determining the Antimicrobial Susceptibility of *Cutibacterium acnes* Isolated from Patients with Acne Vulgaris

Nilay ÖZEL KAYA¹(ID), İnan USTA²(ID), Zeynep Özlem DEMİRÇAY²(ID),
Nurver ÜLGER TOPRAK^{1*}(ID)

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Istanbul, Turkey.

² Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Marmara University Faculty of Medicine, Department of Dermatology, Istanbul, Turkey.

*Bu çalışma, yüksek lisans tezi olup Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi (BAPKO) tarafından araştırma bursuyla desteklenmiştir (Proje No: SAG-C-YLP-040609-0146).

Makale Atfı: Özel Kaya N, Usta İ, Demirçay ZÖ, Ülger Toprak N. Akne vulgarisli hastalardan üretilen *Cutibacterium acnes* izolatlarının filotiplendirilmesi ve antimikrobiyallere duyarlılık durumlarının belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):465-479.

ÖZ

Gram-pozitif anaerop bir difteroid olan *Cutibacterium acnes* (eski adıyla *Propionibacterium acnes*), normal cilt mikrobiyotasının bir üyesidir; akne lezyonlarından sıklıkla izole edilmekte ve fırsatçı bir patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son 10 yılda, *C.acnes* izolatlarının farklı filotipleri keşfedilmiş, özgül filotipler belirli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. *C.acnes* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antimikrobiyallere artan oranda direnç bildirilmiştir. Direnç oranları, farklı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte, Türkiye’de *C.acnes* izolatlarının antimikrobiyallere duyarlılık durumuna ilişkin bilgiler sınırlıdır. *C.acnes* izolatlarının filotiplerinin belirlenmesi ve antimikrobiyal duyarlılık verilerinin sağlanması, hastalığın patogenezi anlamada, direnç gelişimini önlemede, akılcı ve etkili ampirik tedavinin uygulamasında çok faydalı olacaktır. Bu çalışmada, *C.acnes* filotiplerini ve antimikrobiyal duyarlılık paternlerini belirlemek ve *C.acnes* filotipleri ile akne şiddeti ve antimikrobiyallere direnç arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Altı aylık zaman diliminde, üniversite hastanemiz dermatoloji polikliniğine başvuran 57 hastanın akne lezyonlarından ve 62 sağlıklı kontrol grubunun derisinden üretilen *C.acnes* izolatları çalışmaya alınmıştır. Yüz ve göğüs/sırt bölgesindeki akne lezyonlarının şiddeti küresel akne derecelendirme sistemi [Global Acne Grading System (GAGS)]’ne göre puanlandırılmıştır. Akne şiddeti; skoru 1 ile 18 arasında olanlar hafif, 19-30 arasındakiler orta, 31-38 arasındakiler şiddetli ve 39’dan fazla olanlar ise çok şiddetli şeklinde derecelendirilmiştir. İzolatlar matrisi aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon- uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] ile tanımlanmıştır. Filotip analizi, özgün primerler kullanıla-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Nurver Ülger Toprak, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Başbüyük Yerleşkesi, Maltepe/İstanbul, Türkiye.
Tel (Phone): 0216 421 22 22-1713. **E-posta (E-mail):** nurverulger@yahoo.com

rak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılmıştır. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] tarafından anaerob bakteriler için önerilen agar dilüsyon yöntemi ile klindamisin, eritromisin, azitromisin, tetrasiklin ve doksisisiklin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Gerek hasta gerekse kontrol grubundaki izolatların çoğunluğunu (hasta; n= 47, kontrol; n= 47) filotip IA oluşturmuş, bunu sırasıyla tip IB ve tip II izlemiştir. Tip III *C.acnes* suşlarına rastlanmamıştır. Akne şiddeti ile bakteriyel filotipler arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. Akne hastaları grubunda klindamisin, eritromisin, azitromisin, tetrasiklin ve doksisisikline direnç oranları sırasıyla %22.8, %29.8, %35.2, %3.5 ve %5.3 bulunmuş; kontrol grubunda ise bu antimikrobiyallere direnç insidansı sırasıyla %11.3, %21, %38.7, %1.6 ve %1.6 saptanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında eritromisin dışında ($p= 0.043$, Fisher's exact) antimikrobiyallere direnç açısından anlamlı fark bulunmamış; her iki grupta da antimikrobiyallere direnç ile filotipler arasında bir ilişki gözlenmemiştir. İki veya daha fazla antimikrobiyale dirençli izolat sayısı, akne hastalarında daha fazla oranda tespit edilmiştir. *C.acnes* izolatlarında klindamisin, eritromisin ve azitromisine yüksek oranda direnç bulunmuştur. Filotiplerlerden Tip IA çoğunluğu oluşturmuştur. *C.acnes* filotipi ile antimikrobiyal direnç ve akne şiddeti arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

Anahtar kelimeler: *Cutibacterium acnes*; akne vulgaris; filotip; antimikrobiyal duyarlılık; GAGS skoru.

ABSTRACT

Cutibacterium acnes (formerly known as *Propionibacterium acnes*), obligate anaerobic gram-positive diphtheroid, is a member of normal skin microbiota and frequently isolated from acne lesions and also in various infections as an opportunist pathogen. Within the last decade, distinct phylogroups of *C.acnes* have been discovered, and specific strains associated with human disease were defined. Increasing resistance to antimicrobials used in the treatment of *C.acnes* infections has been reported. Resistance rates vary among isolates from different geographic locations. However, knowledge about the antimicrobial susceptibility patterns of *C.acnes* is limited in Turkey. Determining the phylotypes of *C.acnes* isolates and providing antimicrobial susceptibility data will be very useful in understanding the pathogenesis of the disease, preventing the development of resistance, and applying rational and effective empirical treatment. The aim of this study was to determine the phylotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *C.acnes* and to investigate the relationship among *C.acnes* phylotypes, the severity of acne and the antimicrobial resistance. *C.acnes* isolates cultivated from the acne lesions of 57 patients who admitted to the dermatology outpatient clinic of our university hospital and from the skin of 62 healthy control group in a six-month period were included in the study. The acne lesions on the face and chest/upper back were given a score according to the Global acne grading system (GAGS) for describing the severity of acne. The severity was graded as mild if the score was 1-18, moderate with scores from 19 to 30, severe with scores from 31 to 38, and as very severe if the score is more than 39. The isolates were identified by using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Phylotype analysis was performed by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of clindamycin, erythromycin, azithromycin, tetracycline and doxycycline were determined by agar dilution technique recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for anaerobic bacteria. The majority of the isolates (patient; n= 47, control; n= 47) in both of the patient and control groups were phylotype IA, followed by type IB and type II, respectively and no type III *C.acnes* was detected. There was no correlation between acne severity and bacterial phylotypes. The resistance rates of clindamycin, erythromycin, azithromycin, tetracycline and doxycycline were found to be 22.8%, 29.8%, 35.2%, 3.5% and 5.3% in the acne patients group, respectively, whereas in the control group the incidence of resistance to these antimicrobials was 11.3%, 21%, 38.7%, 1.6% and 1.6%, respectively. There was no significant difference in antimicrobial resistance between the patient and control groups, except erythromycin ($p= 0.043$, Fisher's exact) as well as no relationship was found between antimicrobial resistance and phylotypes in both of the groups. The number of isolates, resistant to two or more antimicrobials, was higher in the patients with acne. *C.acnes* isolates were highly resistant to clindamycin, erythromycin and azithromycin. Type IA constituted the majority of the phylotypes. There was no significant relationship between *C.acnes* phylotype, antimicrobial resistance and acne severity.

Keywords: *Cutibacterium acnes* acne vulgaris; phylotype; antimicrobial susceptibility; GAGS score.

GİRİŞ

Normal deri mikrobiyotasında bulunan, akne lezyonlarından en sık izole edilen, kısa bir süre öncesine kadar *Propionibacterium acnes* olarak bilinen, gram-pozitif anaerop pleo-morfik basil özelliğine sahip bakteri, güncellenmiş taksonomiye göre *Cutibacterium acnes* adını almıştır¹. *C.acnes*, akne dışında merkezi sinir sistemi şantları, protez kalp kapakçıkları ve kalça eklem protezleri gibi tıbbi implantların varlığında fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilmekte; endoftalmi, oküler ve perioküler, periodontal ve dental enfeksiyonlara neden olabilmektedir^{2,3}. Bunların yanı sıra, *C.acnes* ile "synovitis acne-pustulosis-hyperostosis-osteitis (SAPHO)" sendromu, sarkoidoz ve prostat kanseri ilişkilendirilmiştir⁴. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda *C.acnes* izolatlarının filogenetik bakımından üç farklı tip sergilediği, bazı hastalıklarla belirli izolat tipleri arasında bağlantının olduğu saptanmıştır^{5,6}.

Akne, daha çok adölesanlarda görülen baş ve üst gövdedeki pilosebace foliküllerin kronik enflamatuvar bir hastalığıdır. Hastalığın oluşumunda *C.acnes* tarafından duktal kolonizasyon ve enflamasyonun yanı sıra genetik faktörler; anormal foliküler keratinizasyon, hormonal etkilere bağlı sebum sekresyonunda artış önemli rol oynar. Akne vulgaris açık ve kapalı komedon, papül, püstül, nodül ve psödokist gibi çeşitli lezyonlarla karakterizedir⁷.

Akne tedavisi hastalığın şiddetine göre belirlenmektedir. Papül ve püstüllerle birlikte bulunan hafif ile orta şiddette enflamatuvar lezyonlar için retinoidlerle kombine edilmiş topikal antimikrobiyaller, orta ile şiddetli enflamatuvar aknesi olan hastalar için oral ve topikal ilaç kombinasyonları; daha şiddetli olgularda ise, ki bunlar genellikle önerilen tedavi yaklaşımlarına yanıt vermemiş olgulardır, oral izotretinoin kullanılmaktadır. Kullanılan sistemik antimikrobiyallerin aynı zamanda anti-enflamatuvar özellikleri de bulunmaktadır. Tedavide seçilen ana sistemik antimikrobiyaller tetrasiklin, minosiklin, doksisisiklin, eritromisin, ampisilin, klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, azitromisin veya sefalosporinlerdir. Bununla birlikte, son yirmi yılda yapılan çalışmalarda antimikrobiyallere artan oranda klinik yanıtızsızlık bildirilmiştir^{7,8}.

Cutibacterium acnes izolatlarında gelişen antibiyotik direnci giderek küresel bir sorun haline gelmiştir. İlk olarak, 1970'lerin başında, ABD'de topikal antibiyotiklere direnç tanımlanmış; 1979 yılında ise klindamisin ve eritromisin antimikrobiyallerine çapraz direnç bildirilmiştir². O zamandan günümüze *C.acnes* izolatlarının antimikrobiyallere duyarlılığını araştıran çalışmalar yapılmış, tedavide sık kullanılan antimikrobiyallerin MİK değerlerinde artış ve önemli oranda direnç geliştiği saptanmıştır. Dünyanın farklı merkezlerinden elde edilen sonuçlara göre en fazla direnç eritromisin ve klindamisine gelişmiş ve bunu tetrasikline direnç izlemiştir^{4,7,8}.

Bu çalışmada, hastanemiz dermatoloji kliniğine başvuran hastaların akne lezyonlarından izole edilen *C.acnes* suşlarının filotiplerinin saptanması, tedavide sıklıkla kullanılan antimikrobiyallere duyarlılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre akne şiddeti ile farklı filotip ve antimikrobiyallere duyarlılık arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 23.01.2009 ve Karar No: MAR-YC-2008-0232).

Akne Vulgarisli Hastaların ve Kontrol Grubunun Belirlenmesi

Çalışmamıza, altı aylık zaman diliminde hastanemiz dermatoloji kliniğine başvuran, son dört hafta öncesine kadar sistemik antibiyotik veya izotretinoin ile topikal herhangi bir akne ilacı almayan; son üç ay öncesine kadar sistemik kortizon veya immünsupresif bir ilaç kullanmayan; 15 ile 35 yaş arasındaki 57 akne vulgarisi olan hastalar (kadın, n= 35 ve erkek, n= 22) dahil edildi. Komedon, papül, püstül, nodül ve eritem lezyonlarının sayısı kaydedilip, akne şiddeti küresel akne evreleme sistemi [Global Acne Grading System (GAGS)]'ne göre derecelendirildi⁹. Yüzde alın, sağ yanak, sol yanak, burun ve çene olmak üzere beş kısım, göğüs ve sırt beraberce bir kısım, toplam altı bölge oluşturuldu; her bölge pilosebace birimlerin yoğunluğu ve dağılımı açısından değerlendirildi. Lokal skorların toplamıyla global skor elde edildi. Global skor değerlerine göre lezyonlar hafif (1-18), orta (19-30), şiddetli (31-38) veya çok şiddetli (> 39) şeklinde sınıflandırıldı. Kontrol grubu olarak herhangi bir antimikrobiyal kullanımı öyküsü bulunmayan 62 sağlıklı kişi (kadın, n= 43 ve erkek, n= 19) çalışmaya alındı.

İzolatların Üretilmesi ve Tanımlanması

Kültür için, hastaların akne lezyon yüzeyleri %70'lik etil alkol ile silindikten sonra papüllerden serum fizyolojik ile ıslatılan eküvyonlar ile sürüntü, diğer lezyonlardan komedon, püstül ya da nodüllerden ise insülin iğnesiyle lezyon içerikleri, kontrol grubunda ise alın bölgesinden steril tuzlu su ile ıslatılan eküvyonla sürüntü alındı. Anaerop taşıma besiyeri (%0.1 tween 80 içeren 0.075 M fosfat tamponlu fizyolojik tuzlu su) içinde laboratuvara ulaştırılan örnekler hemin (5 µg/ml), K vitamini (1 µg/ml) ve %5 oranında koyun kanı içeren zenginleştirilmiş Brucella agara ekilip, anaerop ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) 37°C ısıda yedi gün inkübe edildi¹⁵. Elde edilen kültürde, gram-pozitif boyanma özelliği gösteren, indol oluşturabilen ve katalaz aktivitesine sahip, zorunlu anaerop pleomorfik bakteriler *C.acnes* olarak tanımlandı. Tanımlama sonuçlarımız matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon- uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] (VITEK® MS, bioMérieux, Fransa) analiz yöntemiyle doğrulandı. Her bir hasta ve kontrol grubundan birer *C.acnes* izolatu seçildi.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

İzolatların antimikrobiyallere duyarlılıkları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] tarafından anaerop bakteriler için önerilen agarda dilüsyon yöntemi ile belirlendi (CLSI; M 11-A7)¹⁰. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)], CLSI önerileri ve literatürde yer alan önceki çalışmalar dikkate alınarak duyarlılıkları çalışılan klindamisin (Eis Eczacıbaşı İlaç), eritromisin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD), azitromisin (Deva İlaç, Türkiye), doksisisiklin (Fako İlaç, Türkiye) ve tetrasiklin (Sigma Aldrich,

Tablo I. *Cutibacterium acnes*'in Tanımlanmasında ve Genotiplemesinde Kullanılan Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Büyüklükleri*

Primerler	Primer dizisi (5'- 3')		Ürün baz çifti (bp)
MMf+ (F)	GGA ATA TTG AAC GAG TCG CAG A	<i>C.acnes</i>	633
MMr+ (R)	CGG GTA CGG CAA GAT GTT CT	<i>C.avium</i>	633
PR264 (F)	GCA GGC AGA GTT TGA CAT CC	<i>C.acnes recA</i>	334
PAR-2 (R)	GCT TCC TCA TAC CAC TGG TCA TC		
PR 219	ACG ACC GGT TTG TTG TGA G	<i>C.acnes</i>	
PR 220	GGG TCA ACC TTG ACA ACC AC	Tip IA,	508
		Tip IB	716
PR 245	ATA AAC CCA TCG GCG GCT CGA T	<i>C.acnes</i>	
PR 247	AGC AAG GGA GCA TTC AGT GG	Tip IA, Tip II	4027
		Tip IB	573

*15 numaralı kaynaktan alındı.

bp: Baz çifti.

St. Louis, Missouri, ABD) antimikrobiyallerinin MİK sonuçları değerlendirildi¹¹⁻¹³. Kontrol olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 ve *C.acnes* ATCC 11827 izolatları kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Filotiplerin Araştırılması

İzolatların DNA'ları 95°C'de 20 dakika ısıtılarak elde edildi. Uygun primerler (Tablo I) kullanılarak PCR ile ilkin *Cutibacterium*'a özgü tanımlayıcı gen ve *recA* genleri çoğaltıldı¹⁴. Her iki geni pozitif olan izolatların filotiplerini belirlemek üzere diğer primerler ile PCR işlemi yapıldı. PCR protokolü; 34 döngü ile, 94°C'de 30 saniye DNA denatürasyonu, 55°C (PR245 F ve PR247 R primerleri için 65°C)'de 30 saniye primer eşleşmesi ve 72°C'de 1 dakika primer uzaması olacak şekilde tamamlandı. Kontrol izolatları olarak ATCC 11827 *Cutibacterium acnes* serotip IA, ATCC 11828 *Cutibacterium acnes* serotip II ve Macaristan Szeged Üniversitesi'nden Prof. Dr. Elizabeth Nagy'den temin edilen, *Cutibacterium acnes* 6609 serotip IB kullanıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 90 volt akımda yürütülüp, gözlenen bantlar kontrol köken bantlarıyla kıyaslandı (Şekil 1).

İstatistiksel Analiz

Cutibacterium acnes izolatlarının filotipleri ile akne şiddeti ve antimikrobiyallere direnç arasında bir ilişkinin olup olmadığı Pearson'ın ki-kare, Kolmogorov-Smirnov iki örnek ve Fisher's exact testleriyle araştırıldı, p değeri 0.05'in altında bulunan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Akne yakınmaları 1 ay ile 20 yıldan bu yana (median= 5 yıl) bulunan 57 hastanın muayeneleri yapılmış, lezyonlar GAG skoruna göre 8 ile 37 arasında değişen puanlarla değerlendirilmişlerdir. Hastaların çoğunluğunu (%47, n= 27) orta derecede lezyonlara sahip bulunanlar oluşturmuş, bunu sırasıyla hafif (%30, n= 17) ve şiddetli (%23, n= 13) olgular izlemiştir. Geçmişte, son bir ay öncesinde, hastaların 25 (%44)'i akneleri için

Şekil 1. *Cutibacterium acnes* izolatlarından PR219 ve PR220 primerleri kullanılarak elde edilmiş PCR ürünlerinin etidyum bromür ile boyanmış agaroz jeldeki görünümü.

L: 100 bp moleküler ağırlık belirteci, H: hasta izolatları, (H3: Tip IB, H4: Tip II) K: Kontrol suşları: Kp: ATCC 11828, Kp1: ATCC 11827, Kp2: *C.acnes* 6609.

herhangi bir tedavi almadıklarını, ancak 14 (%25)'ü bir (tetrasiklin; n= 6, azitromisin; n= 5, eritromisin; n= 2, klindamisin; n= 1) ve biri ikili antimikrobiyal ilaçtan oluşan sistemik tedavi aldıklarını açıklamıştır.

PCR ürün paternine göre, gerek hasta gerekse kontrol grubunda izolatların çoğunluğunu (hasta, n= 47 ve kontrol, n= 47) filotip IA oluşturmuş, bunu sırasıyla tip IB ve tip II izlemiştir. Tip III *C.acnes* izolatlarına rastlanmamıştır (Tablo II). Akne şiddeti ile bakteri filotipleri arasında bir bağlantı saptanamamıştır. Hasta ve kontrol grubundaki filotipler arasında antimikrobiyallere direnç bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir.

Çalışmamızda beş antimikrobiyal için elde edilen MİK değerleri Tablo III ve Şekil 2A-2E'de verilmiştir. İzolatlarımızın klindamisin, eritromisin ve azitromisine karşı yüksek direnç geliştirdikleri saptanmıştır; bu antimikrobiyallere duyarlı olmayan izolatların oranı akne hastalarında sırasıyla %22.8, %29.8 ve %35.2 kontrol grubunda ise %11.3, %21 ve %38.7 bulunmuştur. İki grup arasında bu üç antimikrobiyale direnç farkı eritromisin dışında ($p= 0.043$, Fisher's exact) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İzolatlarımızın çoğu tetrasiklin ve doksisisikline duyarlı bulunmuş, gerek MİK₅₀ gerekse MİK₉₀ de-

Tablo II. *Cutibacterium acnes* Filotiplerinin Farklı Şiddete Sahip Akne Lezyonlarında ve Kontrol Grubundaki Dağılımı

Genotip	Akne şiddetine göre lezyon tipleri				Kontrol n
	Hafif n	Orta n	Şiddetli n	Toplam n	
Tip IA	14	22	11	47	47
Tip IB	1	4	1	6	8
Tip II	2	2	0	4	7

Tablo III. <i>Cutibacterium acnes</i> İzolatlarının Antimikrobiyallere Duyarlılık Profilleri																
Antimikrobiyaller Duyarlılık sınır değerler (mg/L)	İzolatlar	MIK değerleri (mg/L)										MIK ₅₀ MIK ₉₀		Duyarlılık profili %		Duyarlı olmayan*
		MIK dağılımlarına göre izolat sayısı														
		0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	> 8			Duyarlı	Duyarlı olmayan*	
Klindamisin ≤ 2	Hasta (n= 57)	1	17	20	0	2	3	1	2	10	1	0.125	8	77.2	22.8	
	Kontrol (n= 62)	0	16	23	6	5	4	1	0	5	2	0.125	8	88.7	11.3	
Eritromisin ≤ 0.5	Hasta (n= 57)	0	5	10	17	8	4	1	0	11	1	0.25	8	70.2	29.8	
	Kontrol (n= 62)	1	9	19	15	5	4	2	0	5	2	0.25	8	79	21	
Azitromisin ≤ 0.5	Hasta (n= 57)	1	10	8	10	8	2	3	2	11	2	0.25	8	64.8	35.2	
	Kontrol (n= 62)	0	10	7	15	6	7	4	2	8	3	0.25	8	61.3	38.7	
Tetrasiklin ≤ 4	Hasta (n= 57)	1	1	1	17	14	20	0	1	2	0	0.5	1	96.5	3.5	
	Kontrol (n= 62)	0	4	0	17	30	10	0	0	1	0	0.5	1	98.4	1.6	
Doksisisklin ≤ 4	Hasta (n= 57)	1	0	1	26	11	15	0	0	3	0	0.5	1	94.7	5.3	
	Kontrol (n= 62)	1	1	1	32	9	16	1	0	1	0	0.25	1	98.4	1.6	

*Duyarlı olmayan; duyarlılık sınır değerlerinin üzerinde MIK'e sahip izolatlar bu gruba dahil edilmiştir.

*Duyarlı olmayan; duyarlılık sınır değerlerinin üzerinde MIK'e sahip izolatlar bu gruba dahil edilmiştir.

Şekil 2. A. Hasta ve kontrol grubu *C. acnes* izolatlarının tetrasiklin MİK dağılımı. B. Hasta ve kontrol grubu *Cutibacterium acnes* izolatlarının doksisisiklin MİK dağılımı. C. Hasta ve kontrol grubu *Cutibacterium acnes* izolatlarının klindamisin MİK dağılımı. D. Hasta ve kontrol grubu *Cutibacterium acnes* izolatlarının eritromisin MİK dağılımı.

Tablo IV. Filotiplere göre Antimikrobiyallere Direnç Dağılımı

Antimikrobiyaller	Dirençli izolatların filotiplere göre dağılımı									
	Dirençli izolat sayısı (n)		Tip IA		Tip IB		Tip II		Hasta	Kontrol
	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol		
Bir veya daha fazla antimikrobiyale direnç										
Klindamisin	2	2	2	1		1				
Azitromisin		11		7		1				3
Klindamisin + azitromisin	3		3							
Azitromisin + eritromisin	13	7	12	7		1				
Klindamisin + azitromisin + eritromisin	8	5	7	4		1				
Doksisisiklin + azitromisin + eritromisin	1		1							
Doksisisiklin + tetrasiklin + azitromisin		1		1						
Doksisisiklin + tetrasiklin + azitromisin + eritromisin	2		2							

ğerleri klinik sınır değerlerinin altında kalmıştır. Hasta grubundan iki, kontrol grubundan da bir izolat tetrasikline dirençli bulunmuş, benzer direnç profili doksisisiklin için de saptanmıştır (hasta grubundan üç, kontrol grubundan bir). Hasta izolatlarının %44.8'i, kontrol grubunun ise %40.3'ü çalıştığımız antimikrobiyallerden en az birine dirençli bulunmuştur. İki veya daha fazla antimikrobiyale dirençli izolatların sayısı hasta grubunda daha fazla görülmüştür (Tablo IV).

TARTIŞMA

Bu çalışmada hastanemiz dermatoloji kliniğine başvuran hastaların akne lezyonlarından üretilen *C.acnes* izolatlarının filotipleri belirlenmiş ve antimikrobiyallere duyarlılıkları tespit edilmiştir. İzolatların tiplendirilmeleri için nükleik asit amplifikasyonuna dayalı yöntem, antimikrobiyal duyarlılıkları için ise CLSI'nın anaerob bakteriler için önerdiği agarda dilüsyon testi kullanılmıştır. Gerek akne lezyonlarından gerekse kontrol grubundan benzer oranda *C.acnes* filotipleri tanımlanmış, Tip IA en fazla oranda saptanmıştır. Her iki grupta izolatların klindamisin, eritromisin ve azitromisine yüksek; tetrasiklin ve doksisisikline düşük oranda direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

C.acnes izolatları, biyolojik özellikleri ve gen dizileri dikkate alınarak Belfast Şemasına göre I, II ve III filotiplerine ayrılmıştır. Tam genom analizi gibi ileri moleküler tekniklerle Tip I'in Tip IA (IA-1, IA-2), Tip IB (IB-1, IB-2, IB-3) ve Tip IC alt tipleri tanımlanmıştır^{6,14}. Farklı filotipler farklı *C.acnes* enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Örneğin prostat kanseri hastalarının örneklerinden en fazla Tip IB ve Tip II filotiplerinin izole edildiği, endodontik enfeksiyonlara ise çoğunlukla Tip II ve III'ün neden olduğu bildirilmiştir^{4,15}.

Son çalışmalar klasik bilgilerin aksine, akne lezyonlarından üretilen *C.acnes* izolatlarının, normal deri sürüntülerinden izole edilenlerden sayısal bakımdan farklı olmadığını göstermiştir. Bu durum *C.acnes*'e bağlı hastalıkların gelişmesinde bakteri sayısından çok izolat temelinde bazı belirleyici özelliklerin varlığına bağlanmıştır³. Bakteri topluluğunda filotiplerdeki dengenin bozulmasının hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynayabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Bu bağlamda *C.acnes* ve onun farklı filotiplerinin iltihaplı akne oluşumundaki rollerini belirlemeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bildirilen çalışma sonuçlarında çelişkiler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar akne lezyonlarında sağlıklı kontrol grubuna göre daha fazla filogenetik çeşitliliğin varlığını belirtirken, bazı araştırmacılar ise bunun tersini ifade etmiştir^{6,14}. Ancak çalışmalarda ortak bulgu, gerek akne lezyonlarında gerekse kontrol grubunda Tip IA ribotipinin baskın olması, Tip II ve Tip III'ün nadiren görülmesidir^{16,17}. Çalışmamızda da akne lezyonlarından üretilen izolatların %82.5'i, kontrol grubundakilerin ise %75.8'ini Tip I filotipi oluşturmuştur. Bunu sırasıyla %11 ve %13 oranlarıyla Tip IB, %7 ve %11 ile Tip II suşları izlemiş, iki grup arasında filotiplerin dağılımı bakımından istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır.

In vitro deneylerle *C.acnes* filotiplerinin farklı enflamatuvar reaksiyon modellerini uyandırabildiği, özgül filotiplerin belirli akne lezyonlarına yol açtığı ve antimikrobiyallere değişen oranlarda direnç gösterdikleri saptanmıştır¹⁷. İleri düzeyde moleküler analizler deride baskın şekilde bulunan Tip IA izolatlarının büyük çoğunluğunu Tip IA-1 alt filotiplerinin oluşturduğunu göstermiştir. Tip IA-1 suşlarının aynı zamanda tedavide kullanılan antibiyotiklere yüksek oranda direnç gösterdikleri anlaşılmıştır. Bakteri popülasyonunda Tip IA-2 suşları daha az oranda saptanmıştır; bu suşlar arasında 16S geninde mutasyona bağlı gelişen tetrasikline dirençli izolatlar bildirilmiştir^{14,17}.

Eritromisin, klindamisin ve tetrasikline karşı gelişen direnç temelde kromozomal kaynaklı olup, ribozomal RNA'yı kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlara bağlanmıştır. 23S

rRNA alt biriminde oluşan mutasyonlar eritromisin ve klindamisin direncine, aynı zamanda makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS) antibiyotiklerinin kendi içlerindeki çapraz dirence neden olmaktadır^{7,8}. Nokta mutasyonların yerine göre MİK düzeylerinde farklılık, antimikrobiyallere çapraz direnç kombinasyonlarında çeşitlilik olmaktadır¹⁴. Ayrıca bir *Corynebacterium* transpozonu olan erm (X) direnç geni taşıyan Tn5432'un *C.acnes* izolatlarına aktarılmasıyla MLS antibiyotik direnci gelişmekte ve direnç düzeyi kromozomal dirence göre daha yüksek bulunmaktadır. Tetrasikline direnç ise 16S rRNA alt birimindeki bir mutasyonla, *Echerichia coli* eş değer baz 1058'de guanin yerine sitozinin geçmesiyle oluşmaktadır. Bu mutasyon organizmanın aynı zamanda doksisikline ve minosikline çapraz direnç göstermesine neden olmaktadır^{7,8,18}. Çalışmamızda direnç mekanizmaları moleküler düzeyde araştırılmamış, fenotipik düzeyde tanımlanmıştır. Hasta grubunda eritromisine dirençli izolatların %82.4'ü azitromisine, %47'si ise klindamisine de dirençli bulunmuştur. Kontrol grubundaki eritromisine dirençli izolatların tamamı azitromisine, %38'i ise klindamisine direnç göstermiştir. Tetrasiklin ve doksisiklin çapraz direnç durumları irdelendiğinde hastalardan üretilen, doksisikline dirençli üç izolatın ikisi tetrasikline ve aynı zamanda eritromisin ve azitromisine de dirençli bulunmuştur. Kontrol grubunda da benzer tablo sergilenmiştir. Her iki grupta tetrasiklin ve doksisikline dirençli olan izolatlar klindamisine duyarlı bulunmuştur (Tablo IV).

Antibiyotiğe dirençli *C.acnes* prevalansı dünyanın farklı yerlerinde değişiklik göstermektedir. Tablo V'te farklı ülkelerden *C.acnes* izolatlarının direnç oranları verilmiştir^{12,13,18,20-29}. Avrupa ülkelerinde direnç oranları oldukça yüksektir; eritromisin/klindamisin direnci ülkelere göre %45 ile %91 arasında; tetrasiklin direnci ise, dirençli izolatları bulunmayan İtalya ve Macaristan'ı hariç tutarsak, %5 ile %26.4 arasında değişmektedir¹⁹⁻²¹. Asya ülkelerinde antibiyotiğe dirençli *C.acnes* prevalansında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Hong Kong'da *C.acnes* izolatlarının %50'den fazla klindamisine, %20'den fazlası eritromisine ve %16'ın üzerinde tetrasiklin/doksisikline direnç bildirilmiştir²². Çin'de ise izolatların %50'sinden fazlası klindamisine/eritromisine, %1.3'ü tetrasikline dirençli, komşu ülke Japonya'da ise aynı antibiyotiklere direnç oranları sırasıyla, yaklaşık %18 ile %4 bulunmuştur^{13,18}. Hindistan'da izolatların tamamına yakınında makrolid ve klindamisine, yaklaşık %30'unda tetrasikline ve %44'ünde ise doksisikline ise direnç bildirilmiştir²³. En fazla dirençli izolatın bulunduğu Hindistan'ın tersine Kanada'da dirençli *C.acnes* prevalansı bir hayli düşük bulunmuştur; klindamisine %7.5, eritromisine ise %12.5 direnç bildirilmiş; buna karşın tetrasiklin ve doksisikline herhangi bir direnç bildirilmemiştir²⁴. Ülkemizden *C.acnes* izolatlarının duyarlılıklarının çalışıldığı iki makaleye ulaşılmıştır. Doğan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada²⁷ *C.acnes* izolatlarının tamamı klindamisin, eritromisin ve tetrasikline duyarlı bulunmuştur. Ergin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki²⁸ direnç oranları çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre daha düşük bulunmuştur. Sonuçlarımız kıyaslandığında, pek çok ülkenin direnç oranlarına göre daha düşük, bununla beraber Kore'den bildirilen oranlara benzer bulunmuş, ancak ülkemiz verilerine göre ise daha yüksek direnç oranları saptanmıştır.

Ülkeler arasındaki farklı direnç oranları, farklı reçete yazma modelleri ve antibiyotiklerin kullanım politikaları ile ilişkilendirilebilir. Geleneksel olarak akne tedavisinde ilk seçenek

Tablo V. Farklı Ülkelerden, Akne Hastalarından Üretilmiş Cutibacterium acnes İzolatlarının Antimikrobiyallere Direnç Oranları

Ülkeler Çalışma yılı	İzolat sayısı n	Antimikrobiyallere direnç oranı (%)					Kaynak No	
		Klindamisin	Eritromisin	Azitromisin	Tetrasiklin	Doksisisiklin		
Birleşik Krallık 1991-2000	4274	48	57.6 (1997'de)	-	12.5 (1991'de) 29.9 (1998'de)	-	Coates ve arkadaşları ²⁰	
Birleşik Krallık Ulkele 1999-2001	664	Birleşik Krallık (n= 106)	50	50	-	26	-	Ross ve arkadaşları ²¹
		Macaristan (n= 68)	45	45	-	0	-	
		İspanya (n= 92)	91	91	-	5	-	
		İsveç (n= 120)	45	45	-	15	-	
		İtalya (n= 128)	58	58	-	0	-	
Avrupa 1999-2001		Yunanistan (n= 150)	75	75	-	7	-	
Kolombiya 2005-2006	100	15	35	-	8	9	Mendoza ve arkadaşları ¹²	
Kanada 2008-2009	80	7.5	12.5	-	0	0	Schafer ve arkadaşları ²⁴	
Hong Kong 2009	111	53.5	20.9	-	16.3	16.3	Luk ve arkadaşları ²²	
Japonya 2009-2010	69	18.8	-	-	4.3	-	Nakase ve arkadaşları ¹⁸	
Meksika 2010	49	36	46	82	14	20	Gonzales ve arkadaşları ²⁵	
Kore 2011	30	30	26.7	-	3.3	6.7	Moon ve arkadaşları ²⁹	
Mısır 2011-2012	115	66.3	49	5.1	18.4	6.1	Abdel-Fattah ve arkadaşları ²⁶	
Hindistan 2012-2014	52	90.4	98	100	30.8	44.2	Sardana ve arkadaşları ²³	
Çin 2015-2017	227	55.5	57.7	58.6	1.3	3.1	Zhu ve arkadaşları ¹³	
Türkiye 2006	53	10	12.5	-	2.5	-	Ergin ve arkadaşları ²⁸	
İstanbul 2017	29	0	0	-	0	-	Doğan ve arkadaşları ²⁷	
Bizim çalışmamız	57	22.8	29.8	35.2	3.5	5.3		

topikal ve oral antibiyotiklerdir. En sık reçete edilen iki topikal antibiyotik olan eritromisin ve klindamisin, akne tedavisinde on yıllardır kullanılmaktadır. Topikal antibiyotiklerin de oral antibiyotikler kadar direnç oluşturma potansiyeline sahip oldukları saptanmıştır^{2,7,8}. Merkezlerden gelen sonuçlar irdelendiğinde, verilerimizde de gözleendiği gibi eritromisin/klindamisine direnç tetrasikline olduğundan daha fazladır^{12,13,18,20-26,28,29}. Bu profilin açığa çıkmasında makrolid antibiyotiklerinin yaygın kullanımı (özellikle solunum sistemi enfeksiyonları için) önemli bir paya sahiptir; indüklenebilir dirence yol açabilir. Diğer yandan tetrasiklin ve doksisisiklin temelde akne olmak üzere, deri enfeksiyonları ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar için kullanılmaktadır; bu dar kullanım alanı dolayısıyla daha düşük direnç oranına neden olmaktadır^{2,7,8}. *C.acnes* izolatlarında antibiyotiklere direnç gelişimini önlemek amacıyla uluslararası ortak tedavi protokolleri geliştirilmiştir. Hastalığın şiddeti baz alınarak, daha hafif olgularda antibiyotikler yerine topikal retinoid, azelaik asit, salisilik asit veya oral izotretinoinlerin kullanımı önerilmektedir³⁰.

Gelişen direnci her zaman antibiyotiklerin kullanılmasıyla ilişkilendirmek pek gerçekçi olmayabilir. Daha önce akne tedavisi almamış hastalarda veya sağlıklı kontrol grubunda da direnç bulunabilmektedir. Çalışmamızda benzer sonuçlar alınmıştır. *C.acnes* direncinin gelişmesinde hastanın yaşı, hastalığın süresi ve şiddetinin de etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca *C.acnes*'in antibiyotiklere direnç oranlarının merkezlerle göre farklılığı; çalışılan bakteri popülasyonlarından, örnekleme yöntemlerinden, uygulanan duyarlılık testinden, değerlendirmede kullanılan MİK klinik sınır değerlerinden de kaynaklanabilmektedir.

Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, izolatları tiplendirmek için belirli özgül genlerin amplifikasyonuna dayalı orta düzeyde tanımlayıcı yöntem seçilmiştir. Kullanılan yöntem, temel filotiplerin tanımlanmasında faydalı olmuştur ancak alt filotipler belirlenememiştir. Alt filotiplerin belirlenebilmesi için multilocus dizi analizi (MLST), daha net sonuçların alınması için ise tam genom analizi gerekmektedir. MLST ve tam genom analizi çok pahalı yöntemlerdir; sonuçları değerlendirebilmek için üst düzey biyoinformatik bilgisine ihtiyaç vardır. Koşullardan optimum düzeyde yararlanılarak yapılan bu çalışma, belirtilen eksikliklerine rağmen ileride yapacağımız çalışmalara temel oluşturması bakımından önemlidir. Çalışmanın diğer zayıf yanı ise, her hastadan birer izolat seçilmiş olmasıdır. Bazı çalışmalar gerek akne lezyonlarında gerekse sağlıklı deride birden fazla filotipin bulunduğunu göstermiştir¹⁴. Ancak gerçek dağılımı belirlemek için bir hastadan kaç izolat çalışılacağı konusunda net bir bilgiye rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, *C.acnes* izolatlarında antimikrobiyallere gelişen direnç akne tedavisinde önemli bir sorun haline gelmiştir. Tetrasiklin ve doksisisiklin iyi antimikrobiyal etkinliğe sahip olmakla beraber, eritromisine ve klindamisine direnç yaygındır. *C.acnes* filotiplerinin, aknelerin şiddeti veya antimikrobiyallere direnç ile bağlantısı bulunamamıştır. Bulgularımızın klinisyene veri sağlaması ve ileride yapacağımız klinik çalışmalara yön vermesi bakımından değerli olduğunu düşünüyoruz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 23.01.2009 ve Karar No: MAR-YC-2008-0232).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Scholz CF, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2016; 66(11): 4422-32.
2. Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and *acne vulgaris*: a brief look at the latest updates. J Eur Acad Dermatol Venereol 2018; 32(Suppl 2): 5-14.
3. Mayslich C, Grange PA, Dupin N. *Cutibacterium acnes* as an opportunistic pathogen: an update of its virulence-associated factors. Microorganisms 2021; 9(2): 303.
4. Leheste JR, Ruvolo KE, Chrostowski JE, Rivera K, Husko C, Miceli A, et al. P. *acnes*-driven disease pathology: Current knowledge and future directions. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 81.
5. McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC, et al. *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. J Clin Microbiol 2005; 43(1): 326-34.
6. Corvec S, Dagnelie MA, Khammari A, Dréno B. Taxonomy and phylogeny of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* in inflammatory skin diseases. Ann Dermatol Venereol 2019; 146(1): 26-30.
7. Cong TX, Hao D, Wen X, Li XH, He G, Jiang X. From pathogenesis of *acne vulgaris* to anti-*acne* agents. Arch Dermatol Res 2019; 311(5): 337-49.
8. Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from *acne* to implant-infections, from phylotype to resistance. Med Mal Infect 2014; 44(6): 241-50.
9. Doshi A, Zaheer A, Stiller MJ. A comparison of current *acne* grading systems and proposal of a novel system. Int J Dermatol 1997; 36(6): 416-8.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, 8th ed. CLSI document, 2012, M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. Available from: <http://www.euc.ast.org>
12. Mendoza N, Hernandez PO, Tying SK, Haitz KA, Motta A. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from *acne* patients in Colombia. Int J Dermatol 2013; 52(6): 688-92.
13. Zhu T, Zhu W, Wang Q, He L, Wu W, Liu J, et al. Antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with *acne* in a public hospital in Southwest China: prospective cross-sectional study. BMJ Open 2019; 9(2): e022938.
14. McDowell A. Over a decade of *recA* and *tly* gene sequence typing of the skin bacterium *Propionibacterium acnes*: What have we learnt? Microorganisms 2017; 6(1): 1.
15. Shannon BA, Cohen RJ, Garrett KL. 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. BJU Int 2006; 98(2): 388-92.
16. Ergin C, Kaleli I, Sahin R, Ergin S, Kaçar N. *Acne vulgaris* hastalarından izole edilen *Propionibacterium acnes* suşlarının biyotiplendirilmesi [Biotyping of *Propionibacterium acnes* strains isolated from patients with *acne vulgaris*]. Mikrobiyol Bul 2006; 40(1-2): 15-21.

17. Zhang N, Yuan R, Xin KZ, Lu Z, Ma Y. antimicrobial susceptibility, biotypes and phylotypes of clinical *Cutibacterium* (Formerly *Propionibacterium*) *acnes* strains isolated from acne patients: an observational study. *Dermatol Ther* (Heidelberg). 2019; 9(4): 735-46.
18. Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan. *J Med Microbiol* 2014; 63(Pt 5): 721-8.
19. Oprica C, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(3): 204-13.
20. Coates P, Vyaknam S, Eady EA, Jones CE, Cove JH, Cunliffe WJ. Prevalence of antibiotic-resistant *Propionibacteria* on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. *Br J Dermatol* 2002; 146(5): 840-8.
21. Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, Coates P, Cunliffe WJ, Bettoli V, et al. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol* 2003; 148(3): 467-78.
22. Luk NM, Hui M, Lee HC, Fu LH, Liu ZH, Lam LY, et al. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27(1): 31-6.
23. Sardana K, Gupta T, Kumar B, Gautam HK, Garg VK. Cross-sectional pilot study of antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes* strains in Indian acne patients using 16s-RNA polymerase chain reaction: A comparison among treatment modalities including antibiotics, benzoyl peroxide, and isotretinoin. *Indian J Dermatol* 2016; 61(1): 45-52.
24. Schafer F, Fich F, Lam M, Gárate C, Wozniak A, Garcia P. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne. *Int J Dermatol* 2013; 52(4): 418-25.
25. González R, Welsh O, Ocampo J, Hinojosa-Robles RM, Vera-Cabrera L, Delaney ML, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in northern Mexico. *Int J Dermatol* 2010; 49(9): 1003-7.
26. Abdel Fattah NS, Darwish YW. In vitro antibiotic susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: an Egyptian university hospital-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27(12): 1546-51.
27. Doğan B, Bektöre B, Karabacak E, Özyurt M. İstanbul'da akne lezyonlarından izole edilen Gram-pozitif bakterilerin antibiyotiklere direnç durumu. *Turkderm-Turk Arch Dermatol Venereology* 2017; 51: 32-6
28. Ergin C, Ergin S, Kaleli I, Kaçar N, Sengül M, Erdoğan BS. Nasal antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* carriage in acne vulgaris patients in Turkey. *J Dermatol* 2006; 33(12): 899-901.
29. Moon SH, Roh HS, Kim YH, Kim JE, Ko JY, Ro YS. Antibiotic resistance of microbial strains isolated from Korean acne patients. *J Dermatol* 2012; 39(10): 833-7.
30. Gollnick HP, Bettoli V, Lambert J, Araviiskaia E, Binic I, Dessinioti C, et al. A consensus-based practical and daily guide for the treatment of acne patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30(9): 1480-90.