MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2012, 64: 203 - 210

Porównanie biochemicznej i genetycznej klasyfikacji szczepów *Propionibacterium acnes* izolowanych ze zmian skórnych od osób z trądzikiem młodzieńczym

A comparison of biochemical and genetic classification of *Propionibacterium acnes* strains isolated from skin lesions of patients with acne

Andrzej Kasprowicz[1], Magdalena M. Owczarek[2], Jacek Międzobrodzki[3], Anna Białecka[1]

[1] Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra,w Krakowie
[2] Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
[3] Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Przeprowadzono analizę 66 szczepów *Propionibacterium acnes*. Szczepy podzielono na typy biochemiczne i genetyczne; oceniano także występowanie β-hemolizy. Biochemiczny typ I sorbitolo-dodatni dominował u 79%, a hemolizę typu β zaobserwowano u 36% badanych szczepów. Wszystkie szczepy typu biochemicznego I reprezentowały genotyp A. Typ II charakteryzował się wysoką zmiennością genotypową obejmując genotypy A, A', B i C. Uzyskane wyniki uzupełnią wiedzę o różnorodności biochemicznej i genetycznej *P. acnes*.

Słowa kluczowe: *Propionobacyerium acnes, trądzik, typowanie biochemiczne, genotypowanie*

ABSTRACT

Introduction: *Propionibacterium acnes* is dominating group of resident bacteria in skin biocenosis. These bacteria participate in autosterilisation of skin with the process of decomposition of triglycerides into free fatty acids and by keeping the pH of skin on the level 5.5. When the process goes out of control the excess of fatty acids in sebaceous glands leads to necrosis and inflammation. Apart of the presence on the skin *P. acnes* also are present in mucous membranes of intestinal tract, eyes, internal ears channels, and in upper respiratory tracts. Traditionally they are regarded as anaerobes, but they tolerate oxygen atmosphere and are resistant to phagocytosis, surviving even in macrophages. These bacteria produce a number of enzymes and proinflammatory factors activating monocytes, stimulating mi-

togenic activity of lymphocytes T. According to common opinion they are responsible for disease *acne vulgaris*, but there are also researchers claiming their low pathogenicity. The list of the *P. acnes* related diseases is not short, some of these diseases may be facilitated by predisposing factors as surgery interventions, diagnostic, or cosmetic procedures. The aim of the study was to compare standard biochemical analysis of *P. acnes* strains to genotypic typing basing on the results from MP-PCR analyses. Relations of hemolysis activity to biochemical types or genetic types were also analysed.

Methods: The analysis of 66 *P. acnes* strains isolated from skin lesions of patients with *acne vulgaris* was performed. A collection of the strains was analysed biochemically according to *Pulverer, Šourek* and *Hoffler* method modified by *Kasprowicz*, and typed genetically by MP-PCR method. Relations of biochemical and genetic types to β-hemolysis of strains were studied.

Results: Dominating biochemical type was type number I grouping 79% of all isolates, and dominant genotype was A which was detected in 75% of all collected strains. β-hemolysis was a feature present in 34% of strains, more frequently in type I (40%) than in type II (12%). β-hemolysis was present only in A-genotype strains, but A-genotype by itself does not determine that reaction: 53% of A-genotype strains does not exhibit β-hemolysis. All type I strains represent A-genotype. Type II was genotypicaly differentiated: all genotypes A, A', B, and C were present.

Conclusions: The results obtained show genotypic heterogenity of *P. acnes* strains and relations to biochemical types. Hemolysis was detected independently to biotype or genotype representation. The results confirm biochemical and genetic heterogenities of *P. acnes,* but the observations also indicate necessity of further microbiological-molecular investigation of that bacteria group using other molecular techniques to the study.

Key words: *Propionibacterium acnes, acne, bacteria, biochemical typing, genotyping*

WSTĘP

Bakterie gatunku *Propionibacterium acnes* stanowią najliczniejszą grupę flory rezydentnej w obrębie biocenozy skóry (2, 19). Biorą udział w samojałowieniu skóry przeprowadzając triglicerydy w wolne kwasy tłuszczowe utrzymując kwasowość skóry na poziomie pH 5,5, co hamuje rozwój innych bakterii. W przypadkach niekontrolowania tej reakcji powstaje nadmiar kwasów tłuszczowych wewnątrz gruczołów łojowych prowadząc do nekrozy warstwy rozrodczej i stanu zapalnego. Poza skórą te Gram-dodatnie maczugowce występują w błonach śluzowych jamy ustnej, jelita grubego, spojówek, w kanałach ucha wewnętrznego i w górnych drogach oddechowych (4, 16). Tradycyjnie bakterie *P. acnes* postrzegane są jako beztlenowce, ale tolerują atmosferę tlenową, wykazując w takich warunkach wydłużony czas rozwoju (3, 10). Bakterie te są oporne na fagocytozę, są też w stanie przetrwać żyjąc w makrofagach, dzięki kompleksowej budowie ściany komórkowej wzbogaconej o powierzchniową warstwę fibrylarną (20).

Po skolonizowaniu ujść gruczołów łojowych bakterie *P. acnes* uwalniają różne enzymy i związki prozapalne o właściwościach chemotaktycznych dla komórek zapalnych, mogące

aktywować monocyty i wykazujące działanie mitogenne wobec limfocytów T (13). Powszechnie przyjmuje się, że bakterie *P. acnes* mają związek z trądzikiem pospolitym, lecz jednocześnie dominuje pogląd mówiący o ich niskiej patogenności.

Lista chorób powiązanych z *P. acnes* obejmuje owrzodzenie rogówki, pooperacyjne zapalenie gałki ocznej, zapalenie rogówki, zapalenie błony naczyniowej oka, zapalenie wsierdzia, sarkoidozę, alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, zespół SAPHO, ropnie okołozębowe, zapalenie zatok i ziarniniakowate zapalenie wątroby związane z przetokami oraz zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Podejrzewa się związek bakterii *P. acnes* z przewlekłym zapaleniem gruczołu krokowego oraz rakiem prostaty (1, 6, 7, 18). Infekcje powodowane przez *P. acnes* są zazwyczaj związane z czynnikami predysponującymi, jak operacje chirurgiczne, niektóre badania diagnostyczne, czy zabiegi kosmetyczne i inne (16). W 2004 roku zsekwencjonowano genom gatunku *P. acnes* (5).

Przedstawiony projekt badawczy miał na celu porównanie klasycznego biochemicznego podziału szczepów gatunku *P. acnes* z podziałem genotypowym przy zastosowaniu metody MP-PCR. Zbadano również powiązania typu biochemicznego tych bakterii z występowaniem β-hemolizy.

MATERIAŁ I METODY

Badania objęły 66 pacjentów w wieku od 13 do 49 lat (średnia wieku=25,9), z czego 59% (n=39) stanowiły kobiety, a 41% (n=27) mężczyźni. Zmiany trądzikowe były zlokalizowane na skórze twarzy, pleców, szyi, klatki piersiowej i na owłosionej skórze głowy. Nasilenie procesu chorobowego oceniano na podstawie liczby zmian oraz ich powierzchni, a także w zależności od występowania towarzyszącego stanu zapalnego. Materiał do badań mikrobiologicznych pobierano bezpośrednio ze zmian skórnych i wysiewano na podłoża z krwią, inkubowane w warunkach tlenowych oraz na podłoża typu Schaedler Agar (Difco), zamykane szczelnie w woreczkach do hodowli w warunkach beztlenowych systemu GENbag (bioMérieux) wraz z generatorem atmosfery beztlenowej GENbag anaer (bioMérieux) absorbującym tlen oraz paskiem wskaźnikowym dla atmosfery beztlenowej (bioMérieux). Zaopatrzony w ten sposób materiał umieszczano w cieplarce o temp. 35° C na 7 dni. Wyhodowano 66 szczepów bakteryjnych, które poddano planowanym badaniom.

Wizualnie oceniano występowanie zjawiska β-hemolizy na podłożach typu Schaedler Agar z domieszką 5% krwinek baranich (bioMérieux). Szczepy klasyfikowano jako hemolizujące, jeżeli dookoła kolonii występowała wyraźna strefa przejaśnienia podłoża. Identyfikacji dokonywano wykorzystując reakcje metaboliczne przy użyciu testu API 20A (bioMérieux) . Wyniki reakcji odczytywano po inkubacji w cieplarce w temp. 35° C przez 3 dni zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta zestawu diagnostycznego. Na podstawie odczytanych wartości bakterie identyfikowano korzystając z oprogramowania komputerowego miniAPI (bioMérieux). Obserwując reakcje wytwarzania indolu, rozkładu żelatyny, hydrolizy eskuliny oraz fermentacji sacharozy i sorbitolu, badane szczepy zaklasyfikowano do typu I bądź II, według schematu *Pulverera, Šoureka* i *Hofflera* w modyfikacji *Kasprowicza* (11).

Do analizy genetycznej używano genomowego DNA uzyskanego z 66 szczepów *P. acnes* przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Bacteria (A&A Biotechnology) według

zmodyfikowanej procedury. Kolonie bakteryjne zeskrobywano z podłoży typu Schaedler Agar (Difco) i zawieszano w 50 µl jałowej wody. Zawiesiny bakterii trzykrotnie zamrażano do temp. -20°C i ponownie rozmrażano, a następnie dodawano do nich 100 µl buforu BS do zawieszania bakterii oraz lizozym w stężeniu 1mg/ml, po czym inkubowano w temp. 37° C przez 1 godzinę. Do probówek dodawano 900 µl zawiesiny lizującej LS oraz 20 µl roztworu proteazy i inkubowano w temp. 37° C przez 2 godziny, a następnie w temp. 75° C przez 5 min. Tak przygotowane próbki intensywnie mieszano oraz wirowano (5 min, 12000 rpm, wirówka typu Sigma 1-15).

Płyn znad osadu przenoszono na kolumienki do izolacji genomowego DNA i wirowano (1 min, 12000 rpm, Sigma 1-15). Do kolumienek dodawano 500 µl roztworu płuczącego A1 i ponownie wirowano (1 min, 12000 rpm, Sigma 1-15). Kolumienki przenoszono do nowych probówek, a następnie dodawano do nich 400 µl roztworu płuczącego A1 i wirowano (2 min, 12000 rpm, Sigma 1-15). Osuszone kolumienki umieszczano w nowych probówkach i zawieszano w 100 µl buforu TE (temp. 75° C). Oczyszczony DNA przechowywano w temperaturze 4° C.

W celu przeprowadzenia reakcji trawienia restrykcyjnego przygotowano mieszaninę reakcyjną (10% 10 x buforu R do trawienia, 1% endonukleazy EcoRI [20 U/ml], 89% genomowego DNA). Adaptor otrzymano w reakcji hybrydyzacji odpowiednio zaprojektowanych oligonukleotydów pomocniczych PowieTm (5' CTCACTCTCACCAACAACGTCGAC 3') i ligowano helpEcoRI (5' AATTGTCGACGTTGG 3'). Do mieszanin po trawieniu restrykcyjnym dodawano mieszaninę ligacyjną (bufor do ligacji 10 x, sporządzony adaptor, DNA ligaza faga T4 [5 U/µl]). Reakcję ligacji prowadzono przez 60 min w temperaturze pokojowej. Przed przeprowadzeniem właściwej reakcji PCR sporządzano gradient temperaturowy w celu wybrania optymalnej temperatury. Przygotowano mieszaninę reakcyjną: 59% wody destylowanej, 10% buforu Shark do reakcji PCR 10 x, 10% dNTPs (8 mM), 10% $MgCl_2$ (20 mM), 1% startera MP EcoRI (100 mM), 2% polimerazy Shark [1 U/µl] oraz 8% produktu reakcji ligacji. Reakcję MP-PCR przeprowadzono zgodnie z profilem temperaturowo czasowym przedstawionym w Tabeli I. Przeprowadzano elektroforezę produktów reakcji MP-PCR w 6% żelu poliakrylamidowym w aparacie Hoeffera (GE Healthcare) w buforze 1 x TBE. Do przeprowadzenia właściwej reakcji PCR przygotowywano mieszaninę reakcyjną stosując identyczne odczynniki oraz proporcje, jak w reakcji sporządzenia gradientu temperaturowego. Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z profilem temperaturowo-czasowym: denaturacja wstępna

Tabela I. Profil czasowo temperaturowy reakcji MP-PCR.

Temperatura [° C]	Czas [s]	Etap	Liczba cykli
72	120	Denaturacja wstępna	Pre-PCR
72	300	Wypełnianie końców	
Gradient: 88,0; 88,4; 88,7; 82,9; 89,8; 90,3; 90,9; 91,4; 91,8;92,3	90	Denaturacja	
Gradient: 88,0; 88,4; 88,7; 89,2; 89,8; 90,3; 90,9; 91,4; 91,8; 92,3	60	Denaturacja	25 cykli
72	135	Przyłączanie starterów i wydłużanie	
72	300	Wydłużanie końcowe	
4	∞	Chłodzenie	

(72° C, 120 s), wypełnianie końców (72° C, 300 s), denaturacja (90° C, 90 s), 25 cykli- denaturacji (90° C, 60 s) i wydłużania (72° C, 135 s), wydłużanie końcowe (72° C, 300 s) i chłodzenie. Przeprowadzono obserwację produktów reakcji PCR po rozdziale elektroforetycznym w warunkach jak powyższe.

WYNIKI

Wyizolowano 66 szczepów gatunku *P. acnes*, z czego większość 77% (n=51) pochodziła ze zmian na twarzy. Ze zmian zlokalizowanych w obrębie skóry pleców wyizolowano 17% szczepów, a 8% ze zmian o innej lokalizacji. Przeważająca liczba szczepów pochodziła od pacjentów, u których nasilenie zmian trądzikowych określono jako ciężkie (55%) i łagodne (45%). Szczepy *P. acnes* wykazywały mikroskopowo jednorodny obraz, były Gram-dodatnie, a pod względem kształtu zaliczono je do maczugowców. Układ komórek względem siebie był podobny do litery „V".

Uzyskane izolaty zidentyfikowano jako szczepy gatunku *P. acnes* stosując testy API 20A (bioMérieux). Wykorzystując reakcje biochemiczne dokonano klasyfikacji szczepów na biochemiczne typy I i II. Wyróżniono 52 szczepy typu I (79%) i 14 szczepów typu II (21%), (Tabela IIA). Na podłożu zawierającym 5% krwinek baranich hemolizę typu β wykazywały 24 szczepy (36%), (Tabela IIB). Wśród 24 szczepów, u których zaobserwowano aktywność hemolityczną, 22 szczepy należały do typu I. Spośród wszystkich przedstawicieli typu I (52 szczepy), hemolizę powodowały 22 szczepy, natomiast w obrębie typu II (14 szczepów), hemolizę powodowały 2 szczepy.

Wszystkie szczepy w liczbie 66 poddano analizie genetycznej. Dzięki zastosowanej procedurze izolacji uzyskiwano genomowy DNA w stężeniu 2-8 ng/µl. Sporządzono gradienty temperaturowe; jako optymalną temperaturę denaturacji dla różnicowania szczepów *P. acnes* wybrano 90° C. Na podstawie przeprowadzonej reakcji MP-PCR spośród wszystkich 66 badanych szczepów wyróżniono 3 genotypy - A, B, C oraz podgenotyp A', (Tabela IIC). Jak

Tabela II. Analiza poszczególnych cech szczepów izolowanych ze zmian trądzikowych.

A) W obrębie biotypów I i II.

Biotyp	Liczba szczepów (%)
I	52 (79%)
II	14 (21%)

B) W obrębie szczepów hemolizujących i niehemolizujących.

Hemoliza	Liczba szczepów (%)
Pozytywna	24 (36%)
Negatywna	42 (64%)

C) W obrębie poszczególnych genotypów.

Genotyp	Liczba szczepów (%)
A	51 (77%)
A'	8 (12%)
B	6 (9%)
C	1 (2%)

przedstawiono w tabeli IIC najliczniej reprezentowany był genotyp A, należało do niego 51 badanych szczepów (77%). Podgenotyp A' różnił się genotypu A jednym prążkiem i był reprezentowany przez 8 szczepów (12%). Genotyp B obejmował 6 szczepów (9%), a genotyp C był reprezentowany przez 1 szczep (2%). Wszystkie szczepy wykazujące hemolizę należały do genotypów A i A'. Jednorodne genotypowo były szczepy zakwalifikowane na podstawie testów biochemicznych do typu I - wszystkie miały genotyp A bądź podgenotyp A', niemniej jednak genotypy A i A' nie były ograniczone wyłącznie do biotypu I. Jak przedstawiono w tabeli III, typ II obejmował wszystkie wyróżnione genotypy: genotyp A stanowił 9%, natomiast genotyp A' 1,5% wszystkich szczepów tego typu, genotyp B obejmował 9%, a genotyp C był reprezentowany przez 1,5% badanych szczepów. Wśród szczepów *P. acnes* izolowanych ze zmian trądzikowych zdecydowanie przeważały szczepy należące do biotypu I (79%) i do genotypów A i A' tego biotypu (79%), (Tabela III).

Tabela III. Udział poszczególnych genotypów w obrębie typów biochemicznych I i II.

Biotyp: szczepy (%)	Genotyp	Liczba szczepów (%)
I 52 (79%)	A	45 (68%)
	A'	7 (11%)
II 14 (21%)	A	6 (9%)
	A'	1 (1,5%)
	B	6 (9%)
	C	1 (1,5%)

DYSKUSJA

Na podstawie wyników testów biochemicznych badane szczepy dzielono na dwa typy: typ I i typ II. Ustalono, że dominuje typ I. Podobną częstotliwość występowania typów I i II wśród szczepów *P. acnes* odnotowali również inni autorzy (8, 15).

Ocena zjawiska β-hemolizy wykazała, że powodowało ją 36% wszystkich szczepów; w większość były to szczepy należące do biochemicznego typu I. Zaledwie dwa szczepy typu II powodowały hemolizę, (Tabela II). W badaniach *McDowell* i wsp. zjawisko to zaobserwowano w przypadku 67% analizowanych szczepów typu I, a w obrębie typu II nie odnotowano go wcale (14). *Hoeffler* wykazał, że β-hemoliza występowała u 50% badanych przez niego szczepów *P. acnes* (10). Odnotował on jednak różnice w występowaniu tego zjawiska w zależności od rodzaju krwi w podłożu bakteryjnym. Najwyższy odsetek szczepów 47,5% wykazywał hemolizę na podłożach z domieszką krwi króliczej, nieznacznie niższy na podłożach z krwią ludzką, natomiast najniższy 22,5% na podłożach z krwią baranią. Przytoczone dane mogą tłumaczyć znaczną różnicę w odsetku szczepów hemolizujących, w badaniach własnych na podłożach z krwią baranią, a w badaniach *McDowella* z krwią ludzką.

W analizie molekularnej posłużono się metodą MP-PCR. Jest to jedna z metod dających tak zwany „odcisk palca" (ang. fingerprint) danego szczepu bakteryjnego w postaci charakterystycznego wzoru prążkowego (12). Przeprowadzone badania wykazały również, że szczepy gatunku *P. acnes* mogą być bezpośrednio związane z gospodarzem i środowiskiem jego życia, co widoczne było w odniesieniu do dwóch szczepów wyizolowanych od bliźniaczek, które to szczepy były biochemicznie i genotypowo identyczne. W pracach opisujących

molekularną klasyfikację *P. acnes* brak jest publikacji, które wykorzystywałyby tę metodę. Obecnie analiza genetyczna tego gatunku dotyczy głównie całkowitego DNA, ze szczególnym uwzględnieniem identyfikacji i charakterystyki genów kodujących enzymy (5**g**).

W 2003 roku *Perry* i wsp. z powodzeniem zoptymalizowali i zastosowali metodę RAPD-PCR (ang. random amplification of polymorphic DNA PCR) do identyfikacji i klasyfikacji *P. acnes* na dwa różne typy (17). W opisanym projekcie nie dysponowali odpowiednimi danymi o analizowanych szczepach, by móc stwierdzić, jak i czy w ogóle wyróżnione grupy odnoszą się do klasyfikacji biochemicznej. Na podstawie badań filogenetycznych, w oparciu o sekwencję genów *recA* oraz *hly*, *McDowell* wyróżnił dwa typy szczepów w obrębie gatunku *P. acnes*, przy czym danych wystarczających do ich rozróżnienia dostarczyła sekwencja tylko jednego genu *recA* (15). Spośród 43 analizowanych przez niego szczepów w przypadku 41 podział biochemiczny pokrywał się z rozróżnieniem na podstawie genu *recA*. *McDowell* analizując sekwencję genu *recA* wyróżnił dwie podklasy w obrębie szczepów *P. acnes* typu I, są to podklasy IA i IB, jednocześnie proponując oznaczenie grupy IB, jako *P. acnes* typu III (14). Szczepy będące przedstawicielami podklasy IB nie przyłączały przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla pierwotnej klasy I, ani specyficznych dla klasy II. Ponadto grupa IB różniła się od pozostałych poziomem ekspresji białkowego czynnika CAMP.

Cytowane powyżej wyniki są zbieżne z uzyskanymi wynikami własnymi, gdzie genotyp A wykazały szczepy należące do biochemicznych typów I i II. Jednak ze względu na ogólny charakter wyników uzyskanych techniką MP-PCR, przedstawiających produkty trawienia restrykcyjnego pojedynczym enzymem, można założyć, że metoda ta w połączeniu z zastosowanym enzymem EcoRI miała zbyt niską siłę dyskryminacji. Jest wielce interesujące, że do dzisiaj nie opublikowano danych wskazujących na genetyczne zróżnicowanie szczepów *P. acnes* typu biochemicznego II.

Zaprezentowane wyniki wzbogacają wiedzę na temat różnorodności genetycznej i biochemicznej *P. acnes*, ale jednoznacznie sygnalizują konieczność kontynuowania badań mikrobiologiczno-molekularnych szczepów tego gatunku oraz wskazują na celowość zastosowania dodatkowo innych technik genetycznych, aby móc zweryfikować dotychczasowe wyniki i poszerzyć aktualną wiedzę o tych drobnoustrojach.

PODSUMOWANIE

1. Wśród przebadanych 66 szczepów Propionibacterium acnes pochodzących ze zmian trądzikowych zdecydowanie dominował biochemiczny typ I (79%).
2. Genetycznie opracowane szczepy wykazały wysoką jednorodność, ponad 79% szczepów reprezentowało genotyp A.
3. Biotyp II występował rzadziej, obejmował 21% badanych szczepów, genetycznie był niejednorodny, gdyż reprezentowany przez kilka genotypów: A, A', B i C.
4. Hemoliza powodowana przez badane szczepy występowała niezależnie od przynależności do biotypu czy genotypu.

PIŚMIENNICTWO

1. *Alexeyew OA, Marklund I, Shannon B* i inni. Direct Visualization of *Propionibacterium acnes* in Prostate Tissue by Multicolor Fluorescent *In Situ* Hybridization Assay. J Clin Microbiol 2007; 45: 3721-8.
2. *Białecka A, Kasprowicz A, Kaszycki P* i inni. Characteristics of the *Propionibacterium* strains isolated from acne patients. Med Dośw Mikrobiol 2004; 56: 79-92.
3. *Bojar RA, Holland KT*. Acne and *Propionibacterium acnes*. Clin Dermatol 2004; 22: 375-9.
4. *Brook I, Frazier EH.* Infections caused by *Propionibacterium* species. Rev Infect Dis 1999; 13: 819-22.
5. *Bruggemann H, Henne A, Hoster F* i inni. The Complete Genome Sequence of *Propionibacterium acnes*, a Commensal of Human Skin. Science 2004; 305: 671-3.
6. *Buggage RR, Shen DF, Chan CC. Propionibacterium acnes* endophtalmitis diagnosed by microdissection and PCR. Br J Ophthalmol 2003; 87: 1190-1.
7. *Csukas Z, Banizs B, Rozgonyi F.* Studies on the cytotoxic effects of *Propionibacterium acnes* strains isolated from cornea. Microb Pathogenesis 2004; 36: 171-4.
8. *Furukawa A, Uchida K, Ishage Y* i inni. Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism. Microb Pathogenesis 2008; 46: 80-7.
9. *Hoeffler U*. Enzymatic and Hemolytic Properties of *Propionibacterium acnes* and Realted Bacteria. J Clin Microbiol 1977; 6: 555-8.
10. *Kasprowicz A*. Bacteriology of *acne* changes. Med Dośw Mikrobiol 1994; 46: 27-34.
11. *Kasprowicz A, Heczko PB, Kucharczyk J.* Suggested classification of skin *Corynebacteria*. Med Dośw Mikrobiol 1974; 26: 264-73.
12. *Krawczyk B, Samet A, Leibner J* i inni. Evaluation of a PCR Melting Profile Technique for Bacterial Strain Differentiation. J Clin Microbiol 2006; 44: 2327-32.
13. *Lodes MJ, Secrist H, Benson DR* i inni. Variable expression of immunoreative surface proteins of *Propiobacterium acnes*. Microbiology 2006; 152: 3667-81.
14. *McDowell A, Perry AL, Lambert PA* i inni. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. J Med Microbiol 2008; 57: 218-24.
15. *McDowell A, Valanne S, Ramage G* i inni. *Propiobacterium acnes* Type I and II Represent Phylogenetically Distinct Groups. J Clin Microbiol 2005; 43: 326-34.
16. *Perry AL, Lambert PA*. *Propiobacterium acnes*. Lett Appl Microbiol 2006; 42: 185-8.
17. *Perry AL, Worthington T, Hilton AC* i inni. Analysis of clinical isolates of *Propionibacterium acnes* by optimized RAPD. FEMS Microbiol Lett 2003; 228: 51-5.
18. *Ramos JM, Esteban J, Soriano F*. Isolation of *Propionibacterium acnes* from Central Nervous System Infections. Anaerobe. 1995; 1: 17-20.
19. *Tancrede C*. Role of human microbiota in health and disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 1012-5.
20. *Webster GF, Leyden JJ, Musson RA* i inni. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to killing and degradation by human neutrophils and monocytes *in vitro*. Infect Immunol 1985; 49: 116-21.

Otrzymano: 3 VII 2012 r.

Adres Autora: 31-016 Kraków, ul. Sławkowska 17, Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dra Jana Bobra