

Molekulárno-genetická charakterizácia kožných baktérií

Mgr. Iveta Gazdaricová

Katedra molekulárnej biológie, Univerzita Komenského v Bratislave

Kožné baktérie majú dokázateľný vplyv na zdravotný status hostiteľa. Všetky ľudské kožné baktérie tvoria so svojimi génmi unikátnu nadstavbu ľudského genómu. Vďaka detailným analýzám pozitívnych a negatívnych asociácií medzi baktériami kože a zdravím hostiteľa môže byť odhalené pozadie niektorých kožných ochorení spojených s kožnými baktériami vo väčšej či menšej miere. Tieto poznatky sme potenciálne schopní využiť pri prevencii a liečbe kožných chorôb pomocou alternatívnej cielenej génovej terapie. Na dosiahnutie tohto cieľa je nevyhnutné vykonať kompletnú molekulárnogenetickú analýzu nepatogénnych kožných baktérií a dokázať ich spojenie so zdravotným statusom hostiteľa. Avšak tieto bakteriálne druhy nie sú bežnými laboratórnymi druhmi a preto je nevyhnuté optimalizovať všetky postupy analýzy.

Kľúčové slová: kožný mikrobióm, molekulárnogenetická analýza baktérií, kultivácia nemodelových bakteriálnych druhov, izolácia DNA

Molecular genetic characterization of skin bacteria

Human skin non-pathogenic bacteria have an evincible impact on a host's health condition. All of the human skin bacteria genes create a unique extension of the human genome. Due to the deep studying of positive and negative associations between skin bacteria and health status of an individual, it can be possible to detect a molecular background of some human skin disorders. Such knowledge would be potentially useful for prevention and treatment of skin diseases by targeted alternative gene therapy. To achieve this goal, it is necessary to perform a complete molecular-genetic analysis of human skin bacteria and to demonstrate their connection to human health status. Moreover, these are not bacteria species from the laboratory, so it is important to build up an optimal pipeline of handling wild human skin bacteria.

Keywords: skin microbiome, molecular genetic analysis of bacteria, cultivation of non-model bacterial species, isolation of DNA

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 16 – 20

Úvod

Najväčším orgánom ľudského tela je koža. Okrem svojej primárnej funkcie (fyzická bariéra medzi vonkajším a vnútorným prostredím tela, ochrana tela pred nebezpečnými látkami a cudzími škodlivými organizmami) je koža domovom pre nespočetné množstvo mikroorganizmov. Najväčšie zastúpenie majú baktérie. Spolu s hubami, vírusmi a malými eukaryotickými organizmami, ako sú roztoče, tvoria tzv. kožný mikrobióm.

Kožné baktérie boli a sú študované ako potenciálna príčina vzniku rôznych chorôb. Dnes však vieme, že mnohé z nich nemajú negatívny vplyv na zdravie jedinca či dokonca pozitívne ovplyvňujú hostiteľa. Bolo preukázané, že niektoré baktérie pozitívne ovplyvňujú imunitný systém hostiteľa tak, že dokážu imunitnú odpoveď modifikovať a dopĺňať. Napríklad dokážu zvyšovať efektívnosť T-buniek pri protizápalovej imunitnej odpovedi⁽¹⁶⁾.

Koža funguje ako osobitý ekosystém. Nachádza sa tu 1,8 m² rôznych habitatov, záhybov, invaginácií a výklenkov, ktoré zabezpečujú nepravidelnú kolonizáciu kože rôznymi bakteriálnymi druhmi. Zastúpenie bakteriálnych druhov závisí od toho, aké sú podmienky v jednotlivých lokalitách na koži. Rozlišujeme suché, vlhké a mastné miesta (**obrázok 1**). V oblastiach na koži, ktoré sú najviac vystavené vzduchu, prevláda kmeň *Proteobacteria*. Oblasť, kde sa nachádza najviac

mazových žliaz, ako je chrbát a tvár, kolonizujú najmä baktérie z kmeňa *Actinobacteria*. Miesta s najvyššou vlhkosťou, ako je chodidlo, sú pokryté hlavne baktériami z kmeňa *Firmicutes*. Okrem týchto kritérií sa množstvo a rozloženie baktérií menia aj počas rastu a dospievania jedinca, v závislosti od životosprávy a miesta života^(2,9,10).

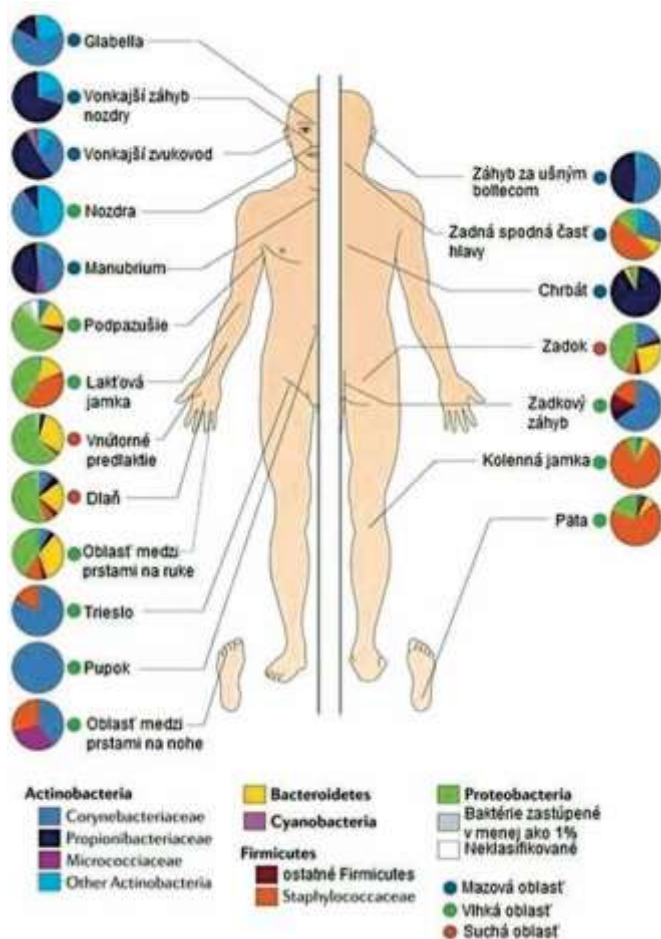
Rovnováha medzi ľudskými kožnými bunkami a kožnými baktériami je veľmi dôležitá. Taktiež je nevyhnuté, aby sa zachovala rovnováha medzi bakteriálnymi druhmi navzájom. Tzv. spontánna necielená dysbalancia môže viesť až ku kožným ochoreniam. Necielenou dysbalanciou rozumieme zmenu v zastúpení kožných baktérií na určitom mieste na tele. Táto zmena môže byť vyvolaná vystavením kože nevhodným podmienkam, nevhodná životospráva alebo dysbalancia môže byť geneticky zakódovaná. Vedci sa snažia odhaliť dysbalanciu detailne a ak je to možné, spojiť ju s určitým ochorením. Dnes vieme, že napríklad ochorenie atopickej dermatitídy je spojené so znížením výskytu *Staphylococcus* a znížením celkovej diverzity kožných baktérií. Viac asociácií ochorenia s kožným mikrobiómom uvádza **tabuľka 1**^(6,9,12)

Cielená zmena mikrobiómu sa snaží využiť poznatky o poškodení rovnováhy na liečenie kožných ochorení. Ak budeme vedieť presnú príčinu kožného ochorenia a bude sa to týkať dysbalancie medzi kožnými bunkami a baktériami na koži, budeme vedieť navrhnúť najefektívnejšie liečenie

ochorenia. Pod cieľenou zmenou mikrobiómu sa skrývajú rôzne prístupy. Jednou z možností je genetická modifikácia kožných baktérií s cieľom zvýšiť tvorbu bakteriocínov, čo sa vykonáva najčastejšie klonovaním do bakteriálnych plazmidov z kožných baktérií, ktoré sa nachádzajú na koži pacienta. Ďalšou možnosťou je umelé zvýšenie počtu chýbajúcich druhov baktérií na určitom mieste na koži⁽¹⁰⁾.

Aby sme mohli pracovať s kožným mikrobiómom, musíme sa naučiť pracovať s kožnými baktériami nachádzajúcimi sa na koži pacienta. Keďže to nie sú laboratórne kmene, práca s nimi nie je triviálna. Je nutné nájsť najefektívnejší postup práce. Všetky postupy od spôsobu odberu cez spôsob kultivácie, izolácie genomickej a plazmidovej DNA, identifikácie bakteriálnych druhov a vyhľadávania bakteriálnych plazmidov a génov sú nevyhnuté optimalizovať.

Obrázok 1. Rozmiestnenie určitých druhov kožných baktérií na povrchu tela človeka



Tabuľka 1. Zmena kožného mikrobiómu asociovaná s niektorými bakteriálnymi druhmi

Ochorenie	Nájdená asociácia s kožným mġicrobiómom	Množstvo vzoriek
Akné vulgaris	Asociácia s baktériou <i>Propionibacterium acnes</i> ⁽⁷⁾	49 chorých + 52 kontrol
Červienka	Zvýšenie výskytu baktérie <i>Demodex follicularum</i> ⁽³⁾	50 chorých + 48 kontrol
Atopická dermatitída	Zvýšenie výskytu <i>Staphylococcus</i> a zníženie celkovej diverzity kožných baktérií ⁽¹⁰⁾	12 chorých + 11 kontrol
Psoriáza vulgaris	Zvýšenie výskytu <i>Corynebacteria</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Streptococcus</i> a <i>Staphylococcus</i> ⁽¹⁾	51 chorých + 51 kontrol
	Zvýšenie výskytu Firmicutes a Actinobacteria ⁽⁸⁾	6 chorých
	Zníženie výskytu <i>Staphylococcus</i> a <i>Propionibacterium</i> ⁽⁵⁾	10 chorých + 12 kontrol
Lupiny	Asociácia s hubami rodu <i>Malessezia</i> ⁽⁴⁾	

Materiál a metodika

Na pokus boli použité stery z kože človeka (vnútorná strana predlaktia a lakťová jamka, 4 zdraví ľudia, každý zo spôsobu odberu bol vykonaný nasledujúci deň, požiadavky na hygienu odberového miesta boli rovnaké pre všetkých – sprchovať sa nami dodaným mydlom maximálne 24 hodín pred odberom) a stery z kože bezsrstej myši pomocou sterilnej vatovej tyčinky Swab plastic stem (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Tá sa namáčala do siedmich rôznych roztokov (MBGW (molecular biology grade water), NaCl (chlorid sodný), Tween-20 (polysorbate 20), PBS (fosfátový pufer), SCF (colony stimulating factor), EtOH (etanol) a NaCl + Tween-20) a sledovali sa prípadné rozdiely. Baktérie boli po odbere vysiate na tuhé LB médium, kde bolo možné separovať jednotlivé bakteriálne druhy. Na namnoženie baktérií bolo použité tuhé a tekuté LB médium, pričom sa pozoroval výtazok. Boli zvolené tri prístupy izolácie bakteriálnej genomickej DNA, ktorých efektívnosť bola porovnávaná. Bakteriálne druhy sa identifikovali pomocou Sangerovho sekvencovania. Bakteriálna plazmidová DNA bola izolovaná použitím dvoch izolačných kitov, ktoré boli porovnávané medzi sebou. Následne sa plazmidy identifikovali pomocou cieľných PCR esejí. Množstvo DNA sa v každom z uvedených prípadov meralo pomocou prístroja Qubit® 2.0 Fluorometer.

Na vyhodnotenie dát pri porovnávaní výsledkov bol využitý štatistický nepárový one-tailed t-test, ktorý porovnáva stredné hodnoty a je schopný porovnať dve variácie a pri hladine významnosti nami zvolenej (5 %) určí, či je rozdiel štatisticky významný, alebo nie je. Nepárový t-test bol zvolený z toho dôvodu, že jednotlivé namerané koncentrácie sa navzájom neovplyvňujú. Bola zvolená one-tailed analýza, lebo distribúcia koncentrácií bola iba v kladných hodnotách na osi X. Taktiež treba uviesť, že všetky dáta v rámci práce boli testované Shapirovým-Wilkovým testom na to, aby sa potvrdilo, že pochádzajú z normálneho rozdelenia. Všetky dáta mali charakter normálneho rozdelenia, takže bolo možné používať parametrické štatistické testy.

Výsledky

Optimalizácia spôsobu odberu baktérií z kože

Bola porovnávaná koncentrácia DNA, ktorá bola získaná použitím rôznych druhov roztokov. Do týchto roztokov bola namáčaná vatová tyčinka. Nulová hypotéza bola stanovená tak, že typ roztoku nemá vplyv na množstvo získanej bakteriálnej DNA. Výsledky sú uvedené na obrázku 2 vľavo.

P-hodnota vzájomného porovňovania rôznych druhov roztokov sa pohybuje nižšie od hodnoty 0,05. V jednom prípade dokonca pod úrovňou 0,01. Z výsledku vyplýva, že roztok NaCl + Tween 20 nie je vhodný na tento typ laboratórnej práce.

Medzi ostatnými roztokmi sa nezistil žiadny významný štatistický rozdiel, takže výber roztoku neovplyvní výťažok bakteriálnej genomickej DNA.

Kultivácia kožných baktérií

Testovalo sa, či konzistencia LB média a prítomnosť/neprítomnosť agaru má vplyv na výťažok bakteriálnej genomickej DNA. Bolo kultivovaných 13 nami získaných bakteriálnych druhov, ktoré bolo nutné namnožiť.

Nulová hypotéza bola stanovená tak, že typ kultivačného média nemá vplyv na výťažok DNA. Výsledky porovnávania sú uvedené na obrázku 2 vpravo.

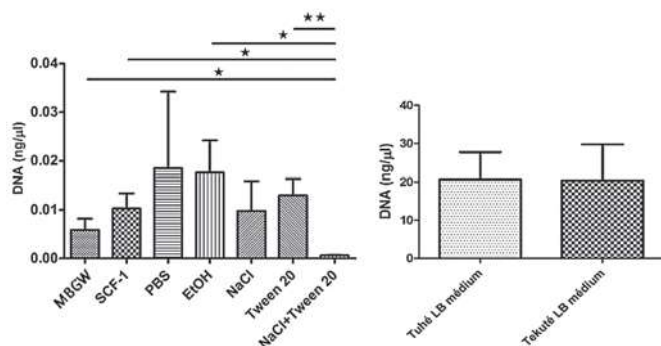
P-hodnota je na úrovni 0,4917, čo znamená potvrdenie nulovej hypotézy.

Izolácia bakteriálnej genomickej DNA

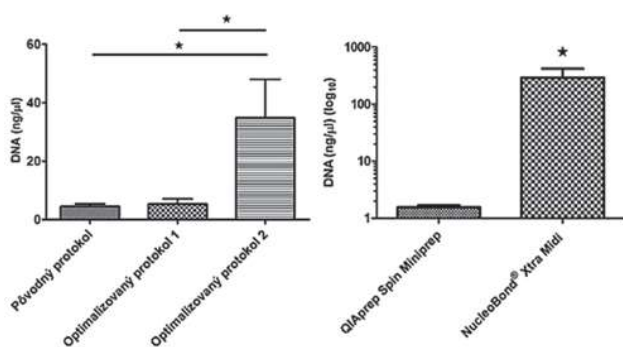
Experimentálne boli porovnávané tri postupy izolácie:

1. Izolačný kit QIAamp® DNA Mini kit 250;
2. 1. Optimalizovaný protokol izolačného kitu QIAamp® DNA Mini kit 250 (doplnenie pôvodného protokolu o teplotné šoky pred prvým krokom 5x striedanie 5 min 90 °C/5 min -20 °C);

Obrázok 2. – Vľavo – Výsledky porovnania závislosti použitého roztoku pri odbere baktérií od množstva získanej bakteriálnej DNA (★ – $P < 0,05$, ★★ – $P < 0,01$). Vpravo – Porovnanie výťažku bakteriálnej DNA z baktérií kultivovaných na tuhom a tekutom LB kultivačnom médiu



Obrázok 3. Vľavo – Porovnanie výťažkov bakteriálnej genomickej DNA získanej použitím troch rôznych izolačných protokolov. Vpravo – Porovnanie výťažku bakteriálnej plazmidovej DNA použitím izolačných kitov DNA QIAprep Spin Miniprep kit a NucleoBond® Xtra Midi



3. 2. Optimalizovaný protokol (zmena oproti pôvodnému protokolu – pufo ATL bol nahradený lyzačným roztokom; bol pridaný roztok lyzozýmu, roztok RNázy; pred pridaním proteínázy K bola pridaná hodinová inkubácia pri 37 °C, po pridaní pufru AL bola pridaná 30-minútová inkubácia pri 55 °C a následne 30-minútová inkubácia pri 70 °C).

Vzájomné porovnávanie výsledkov demonštruje obrázok 3 vľavo. Nulová hypotéza bola stanovená tak, že typ protokolu nemá vplyv na množstvo izolovanej DNA. Výsledkom porovnania pôvodného protokolu s 1. optimalizovaným protokolom je P-hodnota na úrovni 0,3388. Porovnanie pôvodného protokolu s 2. optimalizovaným protokolom dáva P-hodnotu na úrovni 0,0150 a porovnanie 1. optimalizovaného protokolu s 2. optimalizovaným protokolom dáva P-hodnotu 0,0178. Možno teda povedať, že nulová hypotéza sa zamietá v prospech 2. optimalizovaného protokolu, s ktorým sme boli schopní izolovať najväčšiu koncentráciu bakteriálnej genomickej DNA.

Identifikácia získaných bakteriálnych druhov pomocou Sangerovho sekvenovania

Bakteriálne druhy boli identifikované pomocou klasickej metódy Sangerovho sekvenovania 16S rDNA. Podarilo sa nám získať 12 rôznych bakteriálnych druhov – 7 zo sterov z kože človeka a 7 z kože myši, pričom dva druhy sa vyskytli aj u človeka aj u myši. Jednotlivé druhy sú uvedené v tabuľke 2.

Izolácia bakteriálnej plazmidovej DNA

Zo všetkých nami získaných bakteriálnych druhov bolo vybratých šesť, z ktorých sa izolovala plazmidová DNA. Boli porovnané dva izolačné kity DNA QIAprep Spin Miniprep kit a NucleoBond® Xtra Midi. Výsledky sú demonštrované na obrázku 3 vpravo.

Nulová hypotéza bola tradične stanovená tak, že typ izolačného kitu nemá vplyv na množstvo izolovanej plazmidovej DNA. Hypotéza však bola vzhľadom na výsledky zamietnutá v prospech kitu NucleoBond® Xtra Midi.

Tabuľka 2. Získané bakteriálne druhy pomocou Sangerovho sekvenovania

Bakteriálny druh	Gramovo farbenie	Kmeň
človek		
<i>Staphylococcus lentus</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus sciuri</i>	G+	Firmicutes
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus cohnii</i>	G+	Firmicutes
<i>Klebsiella oxytoca</i>	G-	Proteobacteria
<i>Staphylococcus homini</i>	G+	Firmicutes
<i>Bacillus licheniformis</i>	G+	Firmicutes
myš		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G+	Firmicutes
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	Firmicutes
<i>Bacillus subtilis</i>	G+	Firmicutes
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	G+	Firmicutes
<i>Micrococcus luteus</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus hominis</i>	G+	Firmicutes

Identifikácia prítomných plazmidov

Jedným zo spôsobov, ako vyhľadať a identifikovať prítomné plazmidy, je použitie cielených PCR esejí. Na tento experiment bol vybraný bakteriálny druh *Staphylococcus epidermidis*, v ktorom sa vyhľadávali potenciálne prítomné vlastné plazmidy. Bolo navrhnutých šesť párov primerov na šesť rôznych plazmidov. Následne bolo všetkých šesť potenciálnych PCR produktov nanesených na agarózový gél (**obrázok 4**).

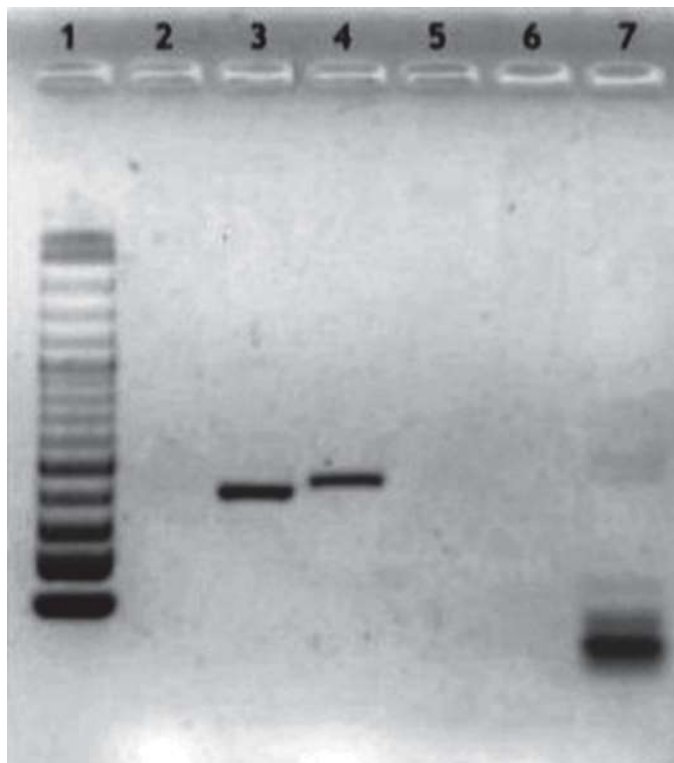
Cielenými PCR esejami bolo možné identifikovať dva plazmidy prítomné v línii nami získanej baktérie *Staphylococcus epidermidis*.

Diskusia

Práca s baktériami, ktoré nie sú klasickými laboratórnymi kmeňmi, je veľmi náročné. Každý krok si vyžaduje práce optimalizovanie. Avšak bez toho by sme sa v tejto oblasti nemohli posunúť ďalej, preto má toto úsilie veľký význam. V mojej práci sú sumarizované najvhodnejšie postupy molekulárnogentickej analýzy nepatogénnych nami získaných baktérií z kože. Bolo možné identifikovať najlepší postup práce.

Optimalizácia spôsobu odberu kožných baktérií bola východisková úloha pre ďalšie experimenty. Bolo vybratých sedem roztokov, do ktorých sa namáčala vatová tyčinka, na zvýšenie výťažku bakteriálnych buniek. Každá z látok má potenciál pozitívne ovplyvniť odber baktérií. Výsledky testovania vylúčili roztok NaCl + Tween 20, pretože sa preukázal ako

Obrázok 4. Separácia a vizualizácia PCR produktov získaných amplifikáciou špecifických úsekov rôznych plazmidov *Staphylococcus epidermidis* (popis dráh: 1 – Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 2 – primery 1 + 2, 3 – primery 3 + 4, 4 – primery 5 + 6, 5 – primery 7 + 8, 6 – primery 9 + 10, 7 – primery 11 + 12)



nevhodný. Dôvodom môže byť rozdielna pH hodnota. Zatiaľ čo pH hodnota kože na predlaktí po 24 hodinách po sprchovaní a nepoužití žiadnych kozmetických prípravkov je od $5,12 \pm 0,56$ do $4,93 \pm 0,45^{(11)}$, tak pH hodnota roztoku je 7,6. Medzi ostatnými látkami nebol štatisticky významný rozdiel. Na záver však bolo možné určiť MBGW ako najideálnejšiu látku, lebo s jej použitím sme získali najmenšiu odchýlku v meraní, má chemické zloženie bez najmenších odchýlok v rámci rôznych laboratórií, čím sa zabezpečí maximálna reprodukovateľnosť experimentu.

Živné médiá, ktoré sa používajú na kultiváciu baktérií, sa líšia svojím zložením a konzistenciou. Ak by sme potrebovali získať čo najviac bakteriálnych druhov, určite by sme zvolili rôzne pôdy, experimentovalo by sa so zložkami a testovali by sa selekčné médiá. V našom prípade bola zvolená klasická LB pôda, pomocou ktorej bolo možné získať dostatočné množstvo bakteriálnych druhov. Avšak experimentálne bolo zisťované, či konzistencia kultivačného média vplyva na výťažok bakteriálnej genomickej DNA. Nenašli sa žiadne signifikantné rozdiely medzi týmito dvoma prístupmi, preto možno povedať, že konzistencia média nemá vplyv na výťažok bakteriálnej DNA.

Ďalším krokom analýzy bola izolácia bakteriálnej genomickej DNA na následné určenie získaných bakteriálnych druhov. Na trhu sú dostupné rôzne izolačné kity, ktoré sa líšia svojou špecifickosťou na určité bakteriálne druhy, či schopnosťou izolácie grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií. Na našom pracovisku sa dlhodobo osvedčil izolačný kit QIAamp® DNA Mini kit 250 od firmy Qiagen, preto bol zvolený ako východiskový, ktorý bol následne podrobený niekoľkým zmenám. Z výsledkov vyplýva, že optimalizácie viedli k zvýšeniu výťažku bakteriálnej DNA, preto boli uvedené do praxe.

Bakteriálne druhy boli identifikované pomocou sekvenovania 16S rDNA kódujúcej sekvencie. Táto sekvencia obsahuje vysokokonzervované úseky s vysokou medzidruhovou variabilitou, čo je dôvodom, prečo je táto sekvencia vhodná pri identifikácii bakteriálnych druhov^(14,15). Na tento konzervovaný úsek bolo navrhnutých niekoľko párov⁽¹³⁾, z ktorých boli pre túto štúdiu vybraté dva – 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG-3') a 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Výsledkom bola úspešná identifikácia trinástich bakteriálnych druhov, ktoré sú uvedené v **tabuľke 2**. Z nich bolo na základe určených vlastností (nepatogenita a výskyt na koži) vybratých šesť, z ktorých bola izolovaná plazmidová DNA. Z veľkej škály dostupných izolačných kitov boli vybraté dva kity, ktoré boli porovnávané. Na základe výsledkov sa ako lepší ukázal NucleoBond® Xtra Midi.

Cielená PCR esej je dobrým nástrojom na vyhľadávanie špecifických úsekov DNA vo vzorke. Práve týmto prístupom boli vyhľadávané bakteriálne plazmidy v našom experimente. Zo všetkých získaných druhov bol vybratý iba *Staphylococcus epidermidis* preto, že z druhov nami získaných má najviac opísaných vlastných plazmidov so známou sekvenciou. Navrhli sme šesť párov primerov na šesť plazmidov. PCR produkty boli nanesené na gélovú elektroforézu, na ktorej bola úspešne identifikovaná prítomnosť práve dvoch bakteriálnych plazmidov pUR3036 a pSK103.

Záver

Na to, aby bolo možné uvažovať o cielej zmene kožného mikrobiómu, je potrebné najprv sa naučiť s nelaboratornými baktériami pracovať čo najlepšie a najefektívnejšie. Na to nám slúžia práve takéto experimenty, ktoré vymedzujú tie najlepšie metódy a postupy.

Plazmidy, ktoré boli týmto postupom získané, by mali byť následne analyzované a neskôr potenciálne využité pri

alternatívnej génovej terapii. Gén záujmu by sa mohol vkladať do tých plazmidov, ktoré by boli následne vložené späť do baktérie. Takto pozmenená baktéria by sa mala ďalej analyzovať a študovať jej potenciálne opätovné osídlenie hostiteľského organizmu s cieľom zdravotného benefitu pre človeka pri liečení kožných ochorení.

LITERATÚRA

1. Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome* 2013; 1(1): 31.
2. Baviera G, Leoni MCH, Capra L. Microbiota in healthy skin and in Atopic eczema. Hindawau Publishing Corporation, BioMed Research International 2014. ID 436921.
3. Casas C, Paul C, Lahfa M, et al. Quantification of Demodex folliculorum by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. *Exp Dermatol* 2012; 21(12): 906-10.
4. Dawson TL. Malassezia globosa and restricta: Breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-Genome analysis. *J Invest Derm Symp* 2007; P12: 15-19.
5. Fahlen A, Engstrand L, Baker BS, et al. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 2012; 304(1): 15-22.
6. Findley K, Grice EA. The Skin Microbiome: A focus on pathogens and their association with skin disease. *PLoS Pathogens* 2014; 10(11): 1004436.
7. Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol* 2013; 133(9): 2152-2160.
8. Gao Z, Tseng CH, Strober BE, et al. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. *PLoS One* 2008; 3(7): 2719.
9. Grice EA. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Seminars in Cutaneous Medicine and surgery* 2014; vol 33.
10. Kong HH, Oh J, Deming C, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012; 22(5): 850-859.
11. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(5): 359-70.
12. Tomida S, Nguyen L, Chiu B, et al. Pan-genome and comparative genome analyses of Propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio* 2013; 4(3): 3-13.
13. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991; 173(2): 697-703.
14. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(11): 5088-5090.
15. Woo PCY, Lau SKP, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Journal Compilation* 2008; 14(10): 908-934.
16. Zeeuwen P, Boekhorst J, van den Bogaard EH. Bacterial pathogenesis. *Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption* 2012. kap.7.



Mgr. Iveta Gazdaricová

Katedra molekulárnej biológie
Univerzita Komenského v Bratislave
Ilkovičova ul. 6, 842 15 Bratislava
e-mail: gazdaricova.iveta@gmail.com