Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

عزل وتشخيص بكتريا Propionibacterium acnes من مرضى يعانون من حب الشباب وتحديد التركيز المثبط الأدنى لبعض المطهرات الشائعة الاستعمال ضدها

إبراهيم محمد سعيد حسين[1] ، نجدت بهجت مهدي[2]

[1,2]جامعة كركوك / كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

lbr.aldawdy@gmail.com[1] , najdatb@yahoo.com[2]

تاريخ استلام البحث: 14 / 12 / 2014 تاريخ قبول البحث: 13 / 4 / 2015

الملخص

شملت الدراسة 175 عينة من أشخاص يعانون من حب الشباب تضمنت 73 عينة فدام Comedones و102 عينة بثور Pustules من 159 مريضا، جمعت عينات من المرضى المراجعين لشعبة الاستشارية الجلدية لمستشفى كركوك العام ومستشفى آزادي التعليمي ،تراوحت أعمارهم بين (12-32) سنة.

نقيت 52 عزلة عائدة لبكتريا Propionibacterium acnes بعد إجراء اختبارات التشخيصية عليها أظهرت النتائج بان نسبة مئوية لتواجد هذه البكتريا كانت اكثر في الفدام مما هو في البثور حيث ان 32 بنسبة عزلة منها عزلت من البثور بنسبة (61.5%) و20 عزلة من البثور وبنسبة (38.5%)، درست قيمة تركيز المثبط الأدنى MIC لمطهرات الديتول، الايودين، المينوداس والسكيولايس، حيث تراوحت قيمتها ضد عزلات بكتريا P.acnes بين (2.5-1.25%)،(1%)، (0.05-0.00312%) و(0.0125-0.00156%) على التوالي.

الكلمات الدالة : بكتريا Propionibacterium acnes، تحديد تركيز مثبط الأدنى للمطهرات.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

Isolation and diagnosis of Propionibacteriun acnes from individuals suffer from acne and determination of MIC for common disinfectants against it

Ibrahem M. Saiid Hussein[1] , Najdat B. Mahdi[2]

[1,2]Department of Biology / College of Science / University of Kirkuk, Iraq

Ibr.aldawdy@gmail.com[1] , najdatb@yahoo.com[2]

Received date : 14 / 12 / 2014 **Accepted date : 13 / 4 / 2015**

ABSTRACT

The study included 175 samples of individuals suffer from acne included 73 Comedones and 102 samples Pustules of 159 patients ,Samples were collected from patients auditors of the Advisory of Dermatology of the Kirkuk General Hospital and Azadi teaching Hospital, between the ages of (12-32) year.

Scrubbed 52 isolation belonging to the bacterium Propionibacterium acnes after diagnostic tests, the results showed that the percentage of the presence of these bacteria were more in comedone than in pastule as 32 isolated them isolated from comedone and 20 isolates of pastule, studied the value of the concentration of minimum inhibitory antiseptic(MIC) for Dettol, iodine, minudes and Sekulyse, ranging value against bacterial isolates P.acnes between (1.25-2.5%) (1%), (0.00312-0.05%) and (0.00156-0.0125%), respectively.

Keyword: *Propionibacterium acnes, disinfectants MIC*

.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

1. المقدمة (Introduction)

حب الشباب Acne vulgaris هو مرض جلدي شائع وهو اعتلال وحدة الدهن للشعرة pilosebaceous unit [1]. ويبدأ عادة في سن المراهقة وينتهي تدريجيا بعد سن الخامس والعشرون من العمر، ولكن يمكن أن تستمر في بعض الأشخاص إلى ما بعد سن الأربعين. حيث إن الغدد الدهنية نشطة وزيادة إنتاج مادة الزهم Sebum تزيد من تفاقم الحالة، لذلك فان الأشخاص ذات البشرة الدهنية تتأثر أكثر بحب الشباب من الأشخاص ذات البشرة الجافة[2]. تظهر حب الشباب في أجزاء الجسم التي تكثر فيها الغدد الدهنية وهي تشمل الوجهFace ،الجزء العلوي من الصدر Upper part of the Chest والظهر Back،إذ تصل كثافة الغدد الدهنية في هذه الأجزاء إلى 900 غدة لكل سم^2 ، وهي الأماكن الأكثر عرضة لحب الشباب بينما تصل كثافتها في بقية أنحاء الجسم إلى اقل من 100 غدة لكل سم^2 [3].

البكتريا *Propionibacterium acnes* متغايرة الأشكال polymorphism لا هوائية متحملة للهواء تتخذ أشكالا مختلفة كالكروي أو العصوي أو تكون بشكل هراوي، تكون خلاياها مفردة أو بشكل أزواج أو متجمعة أو تكون بشكل سلاسل قصيرة وغالبا ما تترتب ما يشبه حرف Y أو حرف V أو ما يشبه الحروف الصينية، يتراوح قطرها بين 0.5 – 0.8 مايكرومتر وطولها بين 1 – 5 مايكرومتر ،موجبة لصبغة كرام غير متحركة ،غير مكونة للسبورات [4] حيث تعد من الأنواع الشائعة في إحداث الإصابة لكونها تمتلك بعض عوامل الضراوة مثل انزيم Lipase المهم في تحليل مادة الزهم وتحويلها الى أحماض دهنية حرة، وقابليتها على إنتاج الإنزيمات الأخرى التي تؤدي إلى إحداث الإصابة[5].حيث تفرز بكتريا *P.acnes* العديد من الانزيمات بما في ذلك الإنزيمات الهاضمة [6] إذ يشارك هذه الإنزيمات في هضم مادة الزهم والمواد المغذية الأخرى الموجودة في المسامات، وان إفراز هذه الإنزيمات يمكن إن يؤدي إلى عدم استقرار طبقات الخلايا التي تشكل جدران المسام، وان وجود خلايا متضررة فضلا عن بروتينات التي تفرزها البكتريا *P.acnes* يسبب التهاب المسام[7].

وان الاستخدام الواسع والعشوائي للمطهرات الكيميائية من غير الاعتماد على الأسس العلمية للتقييس أدى إلى ظهور سلالات مقاومة للمطهرات في العديد من أنواع البكتريا وبآليات مقاومة متعددة، وبالأخص امتلاك البكتريا للبلازميدات التي تكون حاملة لجينات المقاومة [8].

وبناءا على ما تقدم فقد هدفت الدراسة الى:

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

1- عزل وتشخص بكتريا *Propionibacterium acnes* من حالات حب الشباب

2- تحديد تركيز المثبط الادنى لبعض المطهرات الشائعة الاستخدام ضد بكتريا المعزولة

2. طرائق العمل (Materials and Methods)

جمعت 175 عينة من 159 مريض يعانون من حب الشباب من كلا الجنسين تراوحت اعمارهم بين 12-32 سنة، حيث جمعت العينات من الاستشارية الجلدية- مستشفى كركوك العام والاستشارية الجلدية- مستشفى ازادي التعليمي. تضمنت العينات الفدام (Comedone) والبثور (Pustule) وأخذت بعد مسح بشرة 2- 3 مرات بالكحول الأثيلي بتركيز 70 % ، إذ جمعت عينات الفدام بواسطة قالع الفدام (Comedo extractor)، أما البثور فجمعت بوساطة وخزها بلانسيت معقمة (Sterile Lancet) ، ووضعت العينات في انابيب حاوية على وسط مرق ثايوكلايكوليت ونقلت إلى المختبر. مزجت الانابيب الحاوية علي العينات بالخلاط vortex وذلك لتجانس البكتريا في الوسط وحضنت لمدة 5-7 ايام في درجة حرارة 37 °م ثم نقل مقدار عروة ناقل إلى أكار الدم ووضعت الأطباق في المرطبان اللاهوائي (Anaerobic Jar) لمدة 2 – 3 أيام في درجة حرارة 37 °م. بعد حضن العينات لاهوائيا على وسط آكار الدم ومعرفة خصائص المستعمرات النامية على الوسط في ظروف لا هوائية من حيث شكل واللون ومميزات اخرى تم تحضير مسحات صبغة كرام لبكتريا وفحصت تحت المجهر لمعرفة اشكال الخلايا وايجابيتها لصبغة كرام، وكذلك تم اجراء بعض الاختبارات الكيموحيوية المهمة لتشخيص مثل اختبار Oxidase،Catalase ،الاندول، اليوريز، تميع الجيلاتين، اختبار تحلل الدم واختزال النترات.

تحديد التركيز المثبط الأدنى(MIC) للمطهرات الكيمياوية

تم تحديد الـ (MIC) للمطهرات حسب ما ورد في [9] و[10] وكالآتي:-

1- تحضير عالق بكتيري Bacterial suspention

حضرت بأخذ حجم من المستعمرات النقية وزرعها في انابيب اختبار حاوية علي وسط مرق ثايوكلايكوليت مع مزج انابيب الاختبار جيدا لتأكد من انتشار البكتريا في الوسط المغذي ثم قيست درجة النمو في الوسط السائل مع انبوبة ماكفرلاند القياسية. وذلك بعمل عديد من التخافيف وصولا لتركيز ($1.5x10^8$ خلية)، وحضنت في درجة حرارة 37م ولمدة 2-3 ايام.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

2- تحضير المطهرات Disinfectant suspention

تم استخدام اربعة من المطهرات المتداولة في تضميد وتنظيف الجروح والمستخدمة خلال العمليات الجراحية في المستشفيات. والمطهرات المستخدمة هي (Iodine 10%، Dettole 5%، Sekulyse 0.5% و Minudes 0.5%) حيث تم تحضير المطهرات بالماء مقطر وذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة.

3- تحضير تخافيف المطهرات Disinfectant Dilution Suspention

1- اخذت عدد من الانابيب بمعدل 10 أنابيب لكل مطهر حيث تم وضع 9مل من وسط مرق ثايوكلايكوليت في أول أنبوب من الأنابيب العشرة، وتم وضع 5مل من المرق المغذي في كل انبوبة من انابيب التسعة.

2- اخذت 1مل من المطهرات المستخدمة والمحضرة في الفقرة (2) واضيفت الى انبوبة الاولى من الانابيب العشرة والحاوية على 9مل من المرق المغذي ومزجت جيدا باستعمال جهاز المازج الكهربائي Vortex الى ان يتشتت ويمتزج مع المرق المغذي بشكل جيد.

3- اخذت 5مل من الانبوبة الاولى والحاوية على 10مل من المطهر والمرق المغذي ووضعت في الانبوبة الثانية من الانابيب العشرة والحاوية على 5مل من المرق المغذي ومزجت جيدا الى ان تجانس المحلول بشكل جيد.

4- كررت العملية اعلاه عدة مرات لحين وصولها الى انبوبة رقم 10 واخذت منه 5مل واهملت لتكون التخافيف كاملة ومضاعفة وفي كل تخفيف يجب التأكد من تجانس المحلول مع المطهر بصورة كاملة.

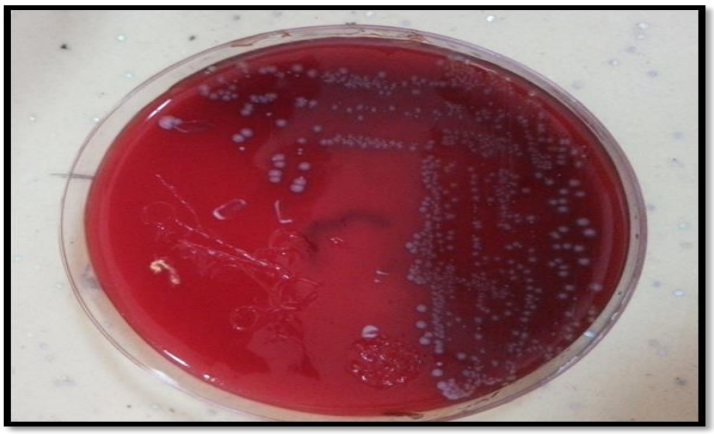
5- بعد إتمام عملية تحضير التخافيف اضيفت 0.1مل من العالق البكتيري والمحضر مسبقا إلى كل تخفيف من التخافيف العشرة المحضرة أعلاه ومزجت جيدا باستعمال جهاز المازج لضمان تجانس العالق البكتيري مع المحلول المطهر.

6- حضنت الانابيب في درجة 37م ولمدة 5-7 ايام، وبعد انتهاء الحضن لوحظ بالعين المجردة مدى تعكر الانابيب وكذلك الانابيب التي لم يظهر فيها نمو او تعكر حيث ان أخر الانبوبة التي لم يظهر فيها نمو او عكورة عد هذا التخفيف هو MIC والتي بعدها الانبوبة توجد فيها نمو. ومن خلال ال MIC لكل مطهر يتم تحديد مدى فعالية المطهر من خلال تثبيط فعل البكتريا او قتلها.

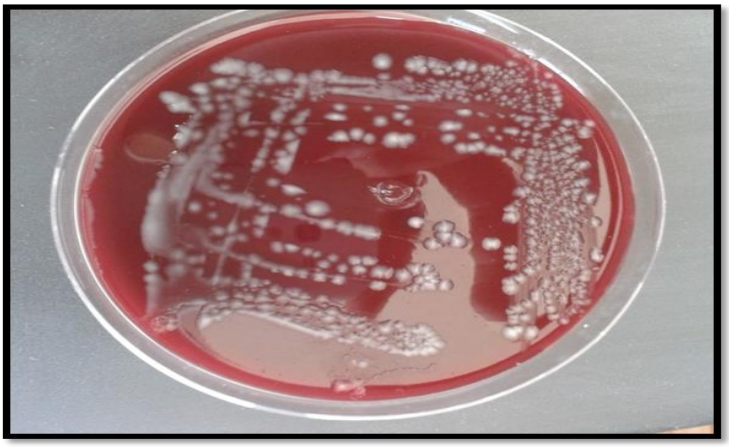
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

3. النتائج والمناقشة (Results and Discussion)

اظهرت النتائج بان مستعمراتها اتخذت الوان مختلفة منها بيضاء او صفراء او رمادية اللون، وان مستعمراتها تكبر في الحجم بمرور الوقت حيث ان مستعمراتها الفتية تكون اصغر من مستعمراتها القديمة.كما موضح في الاشكال (1) و(2).



شكل (1): مستعمرات بكتريا *P.acnes* بعد حضن 3 ايام لاهوائيا على وسط اكار الدم.

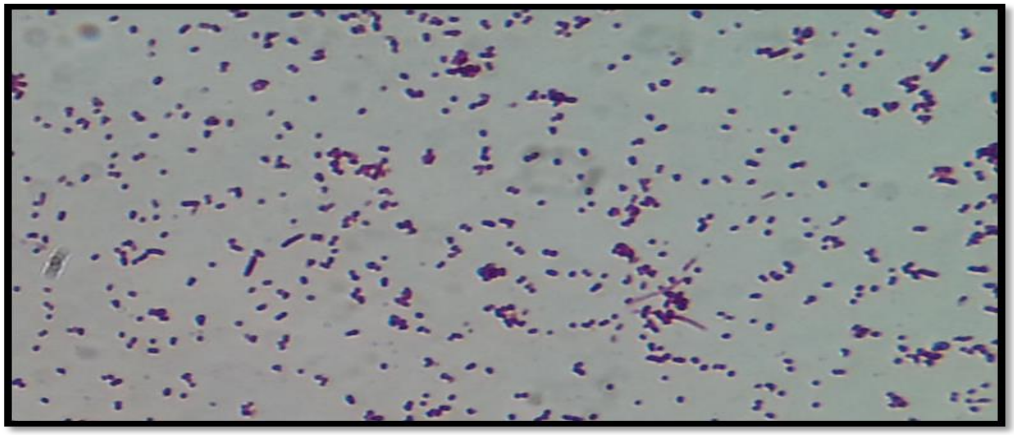


شكل (2): مستعمرات بكتريا *P.acnes* بعد حضن 4 ايام على وسط اكار الدم .

كانت البكتريا موجبة لصبغة كرام، واتخذت أشكالا مختلفة كالكروي أو العصوي أو تكون بشكل هراوي، وكانت خلاياها مفردة أو بشكل أزواج أو متجمعة أو تكون بشكل سلاسل قصيرة وغالبا ما تترتب ما يشبه حرف Y او حرف V او ما يشبه الحروف الصينية،.كما في الشكلين (3) و(4).

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

شكل (3): الشكل العصوي والهراوي لخلايا البكتريا *P.acnes*



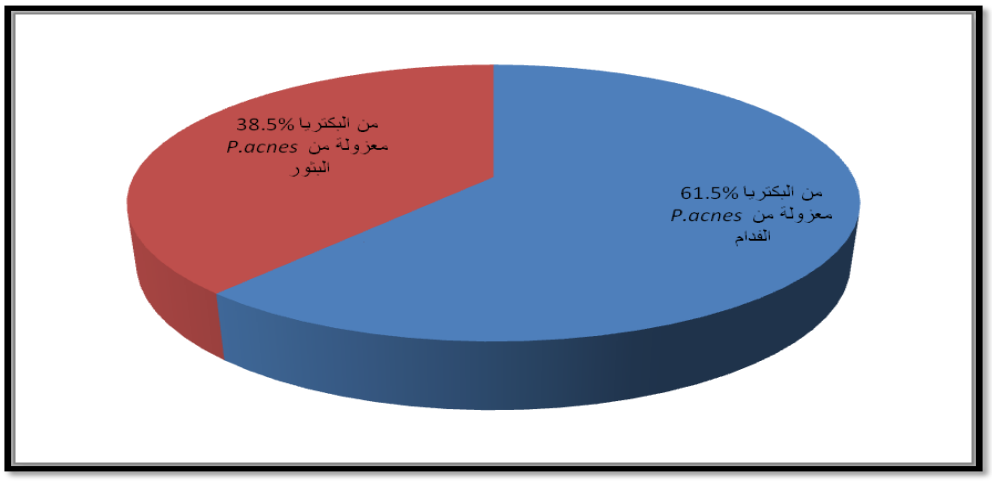
شكل (4): الاشكال المختلفة (كروية، فردية ومزدوجة) لخلايا البكتريا *P.acnes*

اما الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *P.acnes* فكانت موجبة لاختبارات Catalase ، تمييع الجيلاتين ،اختزال النترات ،الاندول. وكانت سالبة لاختبارات Oxidase واليوريز وتحلل الدم من نوع كاما.

حيث تم تشخيص 52 عزلة تابع لبكتريا *Propionibacterium acnes* من 175 مسحة والتي تضمنت 73 عينة من الفدام و102 عينة من البثور، حيث تم عزل 32 منها من الفدام (61.5%) و20 منها من البثور (38.5%) كما موضح في الشكل (5)، يعزى سيادة النوع *P.acnes* في الفدام إلى الضغط الاوكسجيني الواطئ في الفدام مما يؤدي إلى توفير ظروفا ملائمة للبقاء والنمو والتكاثر بشكل جيد[11] و[12].هذه النتيجة متفقة مع الدراسة المحلية لكل من العنبكي

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

عام 2001 [13] والحسيني عام2005[14] حيث ذكرت العنبكي بان 37.3% من البكتريا عزلت من البثور و62.7% من الفدام وذكرت الحسيني بان 43.7% تم عزلها من البثور و56.3% من الفدام.



شكل (5): يوضح النسبة المئوية لعزلات *P.acnes* حسب نوع العينة

حددت التراكيز المثبطة الدنيا للمطهرات الأربعة المستخدمة في هذه الدراسة Iodine، Dettole، Sekulyse و Minudes كونها شائعة الاستخدام في صالات المستشفيات والعمليات وتطهير الجلد وذلك لبيان مدى تأثيرها على الأنواع الجرثومية المعزولة من المرضى المصابين بحب الشباب. الجدول (2) يوضح قيم التراكيز المثبطة الدنيا للمطهرات المستخدمة ضد بكتريا *P.acnes* والتي يوضح بان قيمة MIC للمطهر Iodine بلغت (1%) وتراوحت قيم MIC لل Dettole بين (2.5–1.25%) أما قيم MIC للمطهرين Sekulyse و Minudes فتراوحت بين (0.0125–0.00156%) و (0.05–0.00312%) على التوالي.

جدول(2): يوضح مدى التراكيز المثبطة الدنيا الـ MIC للمطهرات المستخدمة ضد عزلات *P.acnes*

العزلات	المطهرات			
	Iodine	Dettole	Sekulyse	Minudes
P. acnes	1%	(2.5 – 1.25) %	(0.0125 – 0.00156) %	(0.05 – 0.00312) %

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

هذه النتيجة غير متفقة مع دراسة [15] الذين ذكروا بان قيمة MIC لمطهر ديتول بلغت (0.01%).حيث ان هذه النتيجة تبين حساسية عالية لبكتريا *P.acnes* تجاه مطهرين Sekulyse و Minudes وحساسية قليلة تجاه المطهرين Dettole و Iodine . بينت نتائج الدراسة الحالية بان مطهر Sekulyse أكثر تأثيرا على العزلات قيد الدراسة يليها مطهر Minudes، حيث اظهرت حساسية عالية لتراكيز قليلة من المطهرين مقارنة بمطهر Iodine و Dettole ، حيث اظهرت النتائج بان العزلات كانت اكثر مقاومة لمطهر Iodine و Dettole وبتركيز عالي، يعزى السبب الى استخدام مطهر Iodine و Dettole بشكل كبير في الحياة العامة وبشكل عشوائي مع تعرض الجرثومة له باستمرار قد تساهم في نشوء سلالات مقاومة لهذه المضادات[16]، حيث ان تأثير مطهر Dettole على البكتريا يكون ساما للبروتوبلازم وممزقا للجدار الخلوي وبروتيناته، وان تأثير معقد Iodine على البكتريا تكون من خلال الالفة العالية للارتباط مع العديد من الانزيمات والبروتينات في الخلية البكترية وكذلك من خلال هلجنة الحامض الاميني الثايروسين وايقاف بناء البروتين [17].

إن تحمل بعض انواع البكتيرية لتراكيز عالية من المطهرات ناتج من حالتين الحالة الأولى تراكم الشحوم في أو حول جدار الخلية البكترية مما يعيق دخول المطهرات إلى داخل الخلية ، أما الحالة الثانية هي قدرة بعض الجراثيم على تحليل واحياناً استهلاك المطهرات الكيمياوية [16] و[18].

المصادر (References)

[1] S.Knutsen-Larson .; A.L. Dawson.; C.A. Dunnick. and et al.(2012). Acne vulgaris: ***pathogenesis, treatment and needs assessment***. *Dermatol Clin*. 30(1):99-106.

[2] W.J.Cunliffe. and N.B.Simpson. (1998). ***Disorders of the sebaceous glands***. In: Champion,R.H.;Burton, J.L.; Burns ,D.A.and Breathnach, S.M. editors. ***Rook/Wilkinson/Ebling textbo of dermatology***. 6th ed. *Oxford.Blackwell Science.*:1927-1984.

[3] G.J.Goodman. (2001).Post-acne scarring: ***A short review of its pathophysiology*** . *Aus. J. Dermatol*. 42 (2): 84 – 90.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

[4] P.Dali.; E. R. Giugliano.; E. M.Vellozzi. and M. A.Smith.(2001). ***Susceptibilities of Propionibacterium acnes Ophthalmic Isolates to Moxifloxacin*** . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (10): 2969–70.

[5] G.M. Webster. (1995). ***Inflammation in acne vulgaris***. *J. Am. Acad. Derm.* 33: 247 – 253.

[6] C.Holland. (2010). ***Proteomic identification of secreted proteins of Propionibacterium acnes***. *BMC Microbiology* .10: 230.

[7] S.Kim. and C.Christos. (2005). Review of the innate immune response in acne vulgaris: ***activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses***. *Dermatology* .211 (3): 191–2.

[8] A . D. Russel. (2000) . Do biocides select for antibiotic resistance. *j .Pharm.Pharmacol.* 52 : 227 –233

[9] NAIN.(2002). National Antimicrobial Information Network: Benzalkonium Chloride (Alkldimethyl benzyl ammonium chloride) Technical Fast Sheet.

[10] W . Levinson. (2004) . Review of medical microbiology and Immunology . McGraw – Hill. New York.

[11] J.P.Leeming.; K.T.Holland.and W.J.Cunliffe.(1988).The Microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions. *Br. J. Dermatol*. 118: 203 – 208.

[12] C.N.Burkhart.(2003). ***Clinical assessment of acne pathogenesis with treatment implications***. *International Pediatrics*. 18 (1): 14 – 19.

[13] ياسمين حسن علي العنبكي . (2001) . ***دراسة علاقة بعض البكتريا الهوائية واللاهوائية لحب الشباب ومقاومتها لبعض المضادات الحياتية وبعض المعاملات*** ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(149-159)
ISSN 1992 – 0849

[14] أنوار علي عبد الله الحسيني. (2005). ***دراسة بكتريولوجية ووراثية على البكتريا المسببة لحب الشباب***. رسالة ماجستير ،كلية العلوم ، جامعة بابل.

[15] N. Karami.; M.Alsterholm. and J.Faergemann. (2009). ***Activity of Chlorhexidine and Pentane-1,5-diol and their Combination on Candida albicans, Staphylococcus aureus and Propionibacterium acnes.*** Department of Dermatology, and Clinical Bacteriology.

[16] A.D. Russell. (2003). ***Similarities and difference in the response of microorganism to biocides***. *J. antimicrob. Chemother.* 52(5):750-763

[17] W . M. Raoof . (2003) . ***Bacteriological and Genetical study on*** *Pseudomonas* ***aeruginosa,*** ph . D . Thesis , college of medicime , University of Tikrit.

[18] A . Leclaporn .; I . T . Paulsen. ; J . M . lennet .; T . G . Littijohn . and R . A .Skurry . (1994) . multidrug resistance to antiseptics and disenfection in coagulase – negative Staphylococci .J.med .Microbial.40:214-220.

المؤلف

ابراهيم محمد سعيد حسين الداوودي: العراق/ صلاح الدين/ طوز خورماتو، سنة تخرج من الكلية: 2012 جامعة كركوك /كلية العلوم/علوم الحياة، حاصل على شهادة ماجستير سنة 2015 كلية العلوم/جامعة كركوك/اختصاص احياء مجهرية وحاليا اعمل محاضرا في كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كركوك.