# دراسة بكتريولوجية ووراثية على البكتريا المسببة لحب الشباب

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية العلوم – جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم
في علوم الحياة / التقنيات الأحيائية

من
أنوار علي عبد الله الحسيني

**ذو القعدة ١٤٢٦** **كانون الأول ٢٠٠٥**

# ز

﴿ يَا مَعْشَرَ الْجِنِّ وَالْإِنْسِ إِنِ اسْتَطَعْتُمْ أَنْ
تَنْفُذُوا مِنْ أَقْطَارِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ فَانْفُذُوا
لَا تَنْفُذُونَ إِلَّا بِسُلْطَانٍ ﴾

صَدَقَ اللهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمِ

الرحمن : الآية ( ٣٣ )

# إقرار المُشرفَين على الرسالة

نقر أن إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة بابل ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في التقنيات الأحيائية .

التوقيع :
المشرف : د. سامرة يونس يوسف
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
قسم التقنيات الأحيائية / كلية العلوم
جامعة بغداد
التاريخ : / / ٢٠٠٥

التوقيع :
المشرف : د. حسن فاضل ناجي
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة بابل
التاريخ : / / ٢٠٠٥

# توصية رئيس القسم

استناداً إلى التوصية أعلاه المقدمة من قبل الأساتذة المشرفين ، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :
الأسم : د. علي شعلان الأعرجي
المرتبة العلمية : استاذ
رئيس قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة بابل
التاريخ : / / ٢٠٠٥

# قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة نشهد أننا قد اطلعنا على هذه الرسالة ، وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ ١٢ / ٤ / ٢٠٠٦ ووجدنا أنها جديرة بالقبول بتقدير (  ) لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / التقنيات الأحيائية .

التوقيع :
رئيس اللجنة : حبيب صاحب نهر
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة : عبد الكريم عبد الرزاق القزاز
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة : قاسم نجم عبيد
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة ( المشرف ) : سامرة يونس يوسف
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة ( المشرف ) : حسن فاضل ناجي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

**مصادقة عمادة كلية العلوم / جامعة بابل**

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :
الاسم : عودة مزعل الزاملي
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : / / ٢٠٠٦

# الإهداء

إلى روح والدي الحبيب

حُبّاً وتقديساً وافتقاداً

إلى نبع الحنان الصافي، والدتي العزيزة

إجلالاً واحتراماً

إلى قرّة عيني، أختي الغالية خنساء

حُبّاً وتقديراً

أُهدي جهدي المتواضع هذا

أنوار

# شكر وتقدير

**إلهي تصاغر عند تعاظم آلائك شكري ، وتضاءَل في جنب إكرامك إياي ثنائي ونشري ، جللَّتني نعمُك من أنوار الإيمان حُللاً ، وضربت عليَّ لطائفُ برّك من العزّ كِللاً ، وقلَّدتني مِننُك قلائد لا تُحلُّ ، وطوَّقتني أطواقاً لا تُفلّ فآلاؤُك جمَّة ضعُف لساني عن إحصائها ، ونعماؤُك كثيرةٌ قصُر فهمي عن إدراكها ، فضلاً عن استقصائها ، فكيف لي بتحصيل الشُكر وشُكري إيّاك يفتقرُ إلى شُكرٍ ، فكُلّما قُلتُ لك الحمدُ وجبَ عليَّ ذلك أن أقول لك الحمدُ ، وآخرُ دعوانا أنْ الحمد للهِ ربِّ العالمين وصلّى الله على رسولهِ وحبيبهِ محمد المصطفى وعلى آلهِ الأخيار وصحبهِ المنتجبين الأبرار .**

**يطيب لي وأنا أشرف على إنهاء رسالتي أن أتوجه بجزيل شكري وعظيم امتناني إلى استاذتي الفاضلة الدكتورة سامرة يونس يوسف وذلك لاقتراحها موضوع البحث ولمتابعتها المستمرة وجهودها القيمة طوال مدة البحث ، والى أستاذي الدكتور حسن فاضل لمساعدته لي في إنجاز البحث ، جزاهما الله عني خير الجزاء .**

**وأتقدم بالشكر الجزيل إلى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة أساتذة ومنتسبين ولاسيما الدكتور إبراهيم شناوة والدكتور فكرت مجيد الونداوي ، إذ كان أول من شجعني وساندني لإكمال دراستي ، فلهُ كل الخير والوفاء ، ولجميع طلبة الدراسات العليا .**

**أتقدم بجزيل شكري وعظيم امتناني إلى قسم التقنيات الأحيائية في كلية العلوم – جامعة بغداد أساتذة ومنتسبين ، وفي مقدمتهم الدكتورة أليس كريكور أغوب رئيس القسم والدكتور غازي منعم والسيد رائد بحر وذلك لحُسن ضيافتهم ولتوفير مستلزمات البحث ، وإلى جميع طلبة الدراسات العليا لتعاونهم اللامحدود خلال مدة البحث .**

**ولا يسعني إلاّ أن أتقدم بعميق احترامي وعميق امتناني إلى طالبة الدكتوراه دلفاء الكيلاني لمساعدتها ولذوقها الرفيع خلال فترة البحث متمنية لها دوام النجاح والموفقية .**

**كما أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى الدكتورة رغد الصائغ مديرة مركز الحساسية والربو / شعبة الجلدية ، والى كل الذين مدّوا لي يد العون في مستشفى مرجان التخصصي ، وذلك لتعاونهم خلال جمع العينات وفقهم الله لكل خير .**

**وأتقدم بالشكر والعرفان إلى من لا أذكر إلاّ إخلاصهم ومحبتهم طلبة الدكتوراه الأخوات ذكرى عدنان وأزهار عمران ووجدان رضا وفريال جميل .**

**وأتقدم بالشكر الجزيل وعظيم الثناء إلى من غمروني بفيض محبتهم ودوام دعائهم فكانوا لي خير عون وسند لإكمال دراستي ، والدتي العزيزة . . . أخوتي وأخواتي . . . وأحبائي عبير وهيفاء وسُرى .**

**مسك الختام مع رفيقة دربي ومن شاركتني هموم البحث ومخاضاته حرفاً بحرف وكلمة بكلمة ، صديقتي بل أختي الغالية ذكرى عبد العالي الكعبي متمنية لها ولعائلتها الكريمة دوام النجاح والموفقية .**

**وعذراً لمن نسيت . . .**

**وفّق الله الجميع لما فيه خير الدنيا والآخرة .**

أنوار

# Bacteriological and Genetical study on Bacteria causing Acne Vulgaris

**A Thesis**
**Submitted to the Council of College of Science**
**University of Babylon**
**In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master in Biology – Biotechnology**

**By**

*Anwar Ali Abdulla Al-Husseiny*

**Thoulqada١٤٢٦ December ٢٠٠٥**

# Summary

A total of two hundred and fifteen samples were collected from ١٦٦ patients of both sexes who were suffering from Acne Vulgaris. The ages of those subjects ranged from ١٣ to ٣٣ years. These patients were attended to Merjan Specialist Hospital, Department of Dermatology, and the Center of Allergy and Asthma in Hilla City during the period of December, ٢٠٠٣ to July, ٢٠٠٤.

The infection frequencies of Acne Vulgaris were ٥٣٪ in females and ٤٦.٩٪ in males, while the percentages of severity of infection were ١٠.٢٪ and ١٥.١% in females and males, respectively.

Two hundred aerobic and anaerobic gram positive isolates were identified. Morphological characterization and biochemical tests confirmed that ١١٠ isolates were *Staphylococcus epidermidis*, ٢٦ isolates were *Staphylococcus aureus* and ٦٤ isolates were *Propionibacterium acnes*. Five gram negative rods (٢.٤٪) were also isolated.

The antibiotic susceptibility tests of these isolates towards ١٩ antibiotics were checked. It was found that ١٥٪ of *P. acnes* were resistant to ٦ antibiotics (Penicillin – G, Ampicillin, Ampiclox, Amoxycillin, Tetracycline and Erythromycin) and ٣٦٪ of *S. epidermidis* were resistant to ٦ antibiotics (Penicillin – G, Ampicillin, Ampiclox, Amoxycillin, Tetracycline and Erythromycin) while ٤٢٪ of *S. aureus* were resistant to ١١ antibiotics (Penicillin – G, Ampicillin, Ampiclox, Amoxycillin, Amikacin, Gentamycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Trimethoprim, Erythromycin and Lincomycin). Most of isolates showed high sensitivity towards doxycycline, with percentage (٩٢.٣٪), (٩٧.٢٪) and (٩٦.١٪) for *P. acnes*, *S. epidermidis* and *S. aureus* respectively.

A number of virulence factors were studied, all *S. epidermidis* and *S. aureus* isolates were able to produce β - Lactamase, whereas ٧٦.٩٢% of *P. acnes* isolates were able to produce this enzyme. The isolates showed ability to produce Lipase which is one of the important enzyme that play essential role in infection. ٧١.٤٢٪ of *S. epidermidis* and ٥٧.١٤% of *S. aureus* were able to produce Extracellular Slim Substances.

Agarose gel electrophoresis of whole DNA of ٧ isolates of each species of *P. acnes*, *S. epidermidis* and *S. aureus* showed that these isolates were harboured two or three plasmid bands. These were checked by transformation experiments after their expression in *Escherichia coli* MM٢٩٤. The genes responsible for resistance of Penicillin G, Ampicillin, Amoxycillin and Ampiclox were located on these plasmids, these results were confirmed by data obtained from curing experiments.

# الخلاصة


جُمعت ٢١٥ عينة من ١٦٦ مريضاً من كلا الجنسين تراوحت أعمارهم بين ١٣ – ٣٣ سنة ، يعانون من مرض حب الشباب ، هؤلاء المرضى مراجعون لمستشفى مرجان التعليمي التخصصي / قسم الجلدية ، ومركز الحساسية والربو / شعبة الجلدية في مدينة الحلة ، للمدة من كانون الأول / ٢٠٠٣ – تموز / ٢٠٠٤ .

كانت الإصابة بحب الشباب في الإناث أعلى ( ٥٣.١ % ) من الذكور ( ٤٦.٩ % ) ، أما نسب شدة الإصابة فكانت ١٠.٢ % و ١٥.٣ % في الإناث والذكور على التوالي .

نُقيت ٢٠٠ عزلة بكتيرية موجبة لصبغة كرام هوائية ولاهوائية ، وأظهرت نتائج الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية عائدية ٦٤ عزلة لبكتريا *Propionibacterium acnes* اللاهوائية و ١١٠ عزلة لبكتريا *Staphylococcus epidermidis* و٢٦ عزلة لبكتريا *Staphylococcus aureus* ، وتم الحصول على خمسة عزلات عصوية سالبة لصبغة كرام وقد شكلت نسبة قليلة ( ٢.٤ % ) من مجموع العزلات الكلية .

اجري فحص الحساسية الدوائية تجاه ١٩ مضاداً حيوياً شائع الاستعمال طبياً ، لعدد من عزلات الـ *P. acnes* وجميع عزلات *S. epidermidis* و *S. aureus* وأظهرت هذه العزلات صفة المقاومة المتعددة لعدد من المضادات الحيوية ، إذ أبدت ١٥ % من بكتريا *P. acnes* مقاومة لـ ٦ مضادات حيوية هي ( بنسلين ج ، الأمبسلين ، الأمبيكلوكس ، الأموكسلين ، التتراسايكلين والارثرومايسين ) ، بينما كانت ٣٦ % من بكتريا *S. epidermidis* مقاومة لـ ٦ مضادات حيوية هي ( بنسلين ج ، الأمبسلين ، الأمبيكلوكس، الأموكسلين ، التتراسايكلين والارثرومايسين ) في حين كانت ٤٢ % من بكتريا *S. aureus* مقاومة لـ ١١ مضاداً حيوياً هي ( بنسلين ج ، الأمبسلين ، الأمبيكلوكس ، الأموكسلين ، الأميكاسين ، الجنتامايسين ، الكلورومفنيكول ، التتراسايكلين ، التراي ميثبريم ، الارثرومايسين واللنكومايسين ) ، وأبدت العزلات حساسية عالية تجاه مضاد الدوكسي سايكلين وبنسب ٩٢.٣ % و ٩٧.٢ % و ٩٦.١ % لبكتريا *P. acnes* و *S. epidermidis* و *S. aureus* على التوالي .

دُرِسَ عدد من عوامل الضراوة ، إذ كانت جميع عزلات بكتريا *S. epidermidis* و *S. aureus* مُنتجة لإنزيم البيتالاكتميز ( β – Lactamase ) ، بينما كانت ٧٦.٩٢ % من عزلات *P. acnes* منتجة لهذا الإنزيم . وأظهرت جميع العزلات للأنواع البكتيرية الثلاثة القدرة على إنتاج إنزيم اللايبيز ( Lipase ) الذي يلعب دوراً مهماً وأساسياً في إحداث الإصابة بحب الشباب . أعطت ٧١.٤٢ % من بكتريا *S. epidermidis* و ٥٧.١٤ % من بكتريا *S. aureus* القدرة على إنتاج المادة المخاطية خارج الخلوية ( Extracellular Slime Substance ) .

دُرِسَ النسق البلازميدي لسبع عزلات من كل نوع وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي احتواء هذه العزلات على حزمتين أو ثلاث .

أظهرت نتائج تجارب التحول أن بلازميدات بكتريا *S. epidermidis* و *S. aureus* لها القدرة على التعبير المظهري في بكتريا *Escherichia coli* MM٢٩٤ أي أنها ذات مدى مضيفي واسع ، وإن الجينات الوراثية المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية ( بنسلين – ج والامبيسلين والاموكسلين والامبيكلوكس ) كانت بلازميدية الموقع وهذا ما أكدته تجارب التحييد .

# المحتويات


| التسلسل | الموضوع | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| | **الخلاصة** | I |
| | **المحتويات** | III |
| | **المختصرات** | VI |
| | **الأشكال** | VII |
| | **الجداول** | VIII |
| | **الملاحق** | VIII |
| **١ –** | **الفصل الأول – المقدمة** | **١** |
| **٢ –** | **الفصل الثاني – استعراض المراجع** | **٢** |
| ٢ – ١ | حَب الشباب Acne Vulgaris | ٢ |
| ٢ – ٢ | الإمراض وأسباب نشوء المرض Aetiology and Pathogenesis | ٤ |
| ٢ – ٢ – ١ | زيادة إفراز مادة الزهم Increased Sebum Production | ٥ |
| ٢ – ٢ – ٢ | التقرن المُفرط للحويصلة Follicular Hypercornification | ٥ |
| ٢ – ٢ – ٣ | هرمون الأندروجين Androgen Hormone | ٥ |
| ٢ – ٢ – ٤ | الأحياء المجهرية Microorganisms | ٦ |
| ٢ – ٣ | العوامل المؤثرة في تفاقم حب الشباب | ٦ |
| ٢ – ٣ – ١ | عوامل الوراثة Heredity Factors | ٦ |
| ٢ – ٣ – ٢ | عوامل التغذية Dietary Factors | ٦ |
| ٢ – ٣ – ٣ | الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Radiation | ٧ |

| | | |
|---|---|---|
| ٢ – ٣ – ٤ | التعرّق Sweating | ٧ |
| ٢ – ٣ – ٥ | المـــــــواد الكيمياويـــــــة والعلاجـــــــات Drugs and Chemicals | ٧ |
| ٢ – ٣ – ٦ | الإجهاد Stress | ٨ |
| ٢ – ٤ | البكتريا المسببة لحَب الشباب | ٨ |
| ٢ – ٤ – ١ | البربيونيبكتريا Propionibacteria | ٨ |
| ٢ – ٤ – ٢ | المكورات العنقودية Staphylococci | ١٠ |
| **التسلسل** | **الموضوع** | **رقم الصفحة** |
| ٢ – ٥ | عوامل الضراوة Virulence Factors | ١١ |
| ٢ – ٥ – ١ | الهيمولايسين Haemolysin | ١١ |
| ٢ – ٥ – ٢ | إنزيم مُحلل الدهون Lipase | ١٢ |
| ٢ – ٥ – ٣ | المادة المخاطية | ١٣ |
| ٢ – ٥ – ٤ | إنزيم البيتالاكتميز β – Lactamase | ١٣ |
| ٢ – ٦ | مقاومـــــة البكتريـــــا للمضـــــادات الحيويـــــة Antibiotic Resistance of Bacteria | ١٤ |
| ٢ – ٧ | المحتوى البلازميدي Plasmid Profile | ١٥ |
| ٢ – ٨ | التحول البكتيري Bacterial Transformation | ١٦ |
| ٢ – ٩ | تحييد البلازميدات Plasmids Curing | ١٧ |
| **٣ -** | **الفصل الثالث – المواد وطرائق العمل** | **١٨** |
| ٣ – ١ | المواد Materials | ١٨ |
| ٣ – ١ – ١ | الأجهزة Equipments | ١٨ |
| ٣ – ١ – ٢ | المواد الكيمياوية | ١٩ |
| ٣ – ١ – ٣ | الأوساط الزرعية الجاهزة | ٢١ |
| ٣ – ١ – ٤ | المضادات الحيوية Antibiotics | ٢٢ |
| ٣ – ١ – ٥ | السلالات القياسية المستخدمة | ٢٣ |
| ٣ – ١ – ٦ | المواد المتفرقة ومصادرها | ٢٣ |
| ٣ – ١ – ٧ | المحاليل والدوارئ | ٢٤ |
| ٣ – ١ – ٨ | الكواشف والصبغات Reagents and Dyes | ٢٧ |
| ٣ – ١ – ٩ | الأوساط الزرعية المستخدمة | ٢٩ |
| ٣ – ١ – ٩ – ١ | الأوساط الزرعية الجاهزة | ٢٩ |
| ٣ – ١ – ٩ – ٢ | الأوساط الزرعية التركيبية | ٢٩ |
| ٣ – ٢ | طرائق العمل Methods | ٣١ |
| ٣ – ٢ – ١ | جمع العينات | ٣١ |
| ٣ – ٢ – ٢ | زرع العينات | ٣٢ |
| ٣ – ٢ – ٣ | تشخيص العينات | ٣٢ |
| ٣ – ٢ – ٣ – ١ | الصفات المظهرية | ٣٢ |
| **الفقرة** | **الموضوع** | **رقم الصفحة** |
| ٣ – ٢ – ٣ – ٢ | الاختبارات الكيموحيوية | ٣٣ |
| ٣ – ٢ – ٤ | حفظ وإدامة العزلات | ٣٦ |
| ٣ – ٢ – ٥ | اختبار الحساسية الدوائية | ٣٧ |
| ٣ – ٢ – ٦ | اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز | ٣٧ |

| | | |
|---|---|---|
| ٣ – ٢ – ٧ | الكشف عن إنتاج المادة المخاطية | ٣٨ |
| ٣ – ٢ – ٨ | استخلاص الدنا البلازميدي | ٣٨ |
| ٣ – ٢ – ٩ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز | ٣٩ |
| ٣ – ٢ – ١٠ | التحول البكتيري Bacterial Transformation | ٤٠ |
| ٣ – ٢ – ١١ | تحييد البلازميدات Plasmids Curing | ٤١ |
| **٤ -** | **الفصل الرابع – النتائج والمناقشة** | **٤٣** |
| ٤ – ١ | العزل والتشخيص | ٤٣ |
| ٤ – ١ – ١ | عزل جمع العينات | ٤٣ |
| ٤ – ١ – ٢ | تشخيص البكتريا | ٤٥ |
| ٤ – ٢ | مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية | ٤٧ |
| ٤ – ٣ | التحري عن إنتاج إنزيم البيتالاكتميز | ٥٣ |
| ٤ – ٤ | إنتاج المادة المخاطية | ٥٥ |
| ٤ – ٥ | المحتوى البلازميدي | ٥٥ |
| ٤ – ٦ | التحول الوراثي | ٦٤ |
| ٤ – ٧ | تحييد البلازميدات | ٦٦ |
| | **الاستنتاجات** | ٦٩ |
| | **التوصيات** | ٦٩ |
| | **المصادر** | ٧٠ |
| | **الملاحق** | ٨٥ |
| | **ملخص الرسالة باللغة الإنكليزية** | A |


# المختصرات

| المصطلح | المختصر |
|---|---|
| Beta | β |
| Brain Heart Infusion Agar | BHIA |
| Covalently Closed Circular | CCC |
| Coagulase – negative Staphylococci | CONS |
| Coagulase – positive Staphylococci | COPS |
| Deoxyribonucleic Acid | DNA |
| *Escherichia coli* | *E. coli* |
| Ethylendiamine tetra acetic Acid | EDTA |
| Extra Spectrum Beta Lactamases | ESBLs |
| Kilobase | Kb |
| Linear | L |
| Luria Broth | L – Broth |
| Open Circular | OC |
| *Propionibacterium acnes* | *P. acnes* |

| | |
|---|---|
| Rif | Rifampicin |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| *S. aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| *S. epidermidis* | *Staphylococcus epidermidis* |
| SDS | Sodium Dodecyle Sulphate |
| SET | Soduim Acetate EDTA Tris – HCl |
| Spp. | Species |
| TBE | Tris – base – Boric acid – EDTA |
| TE | Tris – base – EDTA |
| TSB | Trypticase Soy Broth |
| TSI | Triple Sugar Iron |

# الأشكال


| الرقم | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| ٤ – ١ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *P. acnes* | ٥٧ |
| ٤ – ٢ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *S. epidermidis* | ٥٩ |
| ٤ – ٣ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *S. aureus* | ٦١ |
| ٤ – ٤ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي للأجناس الثلاثة | ٦٣ |

| | | |
|---|---|---|
| | *S. aureus* و *S. epidermidis* و *P. acnes* | |
| ٤ – ٥ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر الحُزم البلازميدية والكروموسومية للعزلات المستخدمة في التحول | ٦٥ |
| ٤ – ٦ | الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لعزلات *S. epidermidis* و *S. aureus* المعاملة وغير المعاملة بـ SDS | ٦٨ |

# الجداول


| الرقم | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| ٣ – ١ | المضادات الحيوية المستخدمة | ٢٢ |
| ٣ – ٢ | السلالات القياسية | ٢٣ |
| ٤ – ١ | أنواع العينات وتوزيعها حسب الجنس | ٤٣ |
| ٤ – ٢ | العلاقة بين الإصابة بحَب الشباب والفئات العمرية للإناث والذكور | ٤٣ |
| ٤ – ٣ | شدّة الإصابة بحب الشباب لدى الجنسين | ٤٥ |
| ٤ – ٤ | أنواع العزلات في عينات الفدام والبثور | ٤٥ |
| ٤ – ٥ | الاختبارات الكيموحيوية لعزلات *S. epidermidis* و *S. aureus* | ٤٦ |
| ٤ – ٦ | الاختبارات الكيموحيوية لعزلات *P. acnes* | ٤٧ |
| ٤ – ٧ | الحساسية الدوائية لعزلات *P. acnes* | ٤٩ |
| ٤ – ٨ | الحساسية الدوائية لعزلات *S. epidermidis* | ٥٠ |
| ٤ – ٩ | الحساسية الدوائية لعزلات *S. aureus* | ٥١ |
| ٤ – ١٠ | العزلات المنتجة لإنزيم البيتالاكتميز والفترة الزمنية لحصول التغير اللوني | ٥٤ |
| ٤ – ١١ | تأثير المادة المُحيدة SDS في العزلة $SE_2$ *S. epidermidis* والعزلة $SA_1$ *S. aureus* | ٦٦ |


# الملاحق


| الرقم | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| ١ | قطر منطقة التثبيط القياسية لأقراص المضادات الحيوية المستعملة | ٨٥ |

# ١ ـ المقدمة Introduction

حب الشباب ( Acne Vulgaris ) هو اعتلال وحدة الدهن للشعرة ( Pilosebaceous Unit ) والتي تشمل الغدة الدهنية واقنيتها الموجودة في الجلد إذ تحمل إفرازاتها الزهم ( Sebum ) إلى سطح الجلد ( Burkhart, ٢٠٠٣ ) . يكثر تواجد هذه الغدة في الوجه والصدر والظهر، وهي الأماكن التي يسود فيها ظهور حب الشباب ( Thiboutot, ٢٠٠٠ ) .

يتميز حب الشباب بتواجده بنوعين غير الالتهابي ( Non – Inflammatory ) ويشمل الفدام ( Comedones ) بنوعيه المفتوح ذو الرأس الأسود والمغلق ذو الرأس الابيض ، والالتهابي ( Inflammatory ) ويشمل الحطاطات ( Papules ) والبثور ( Pustules ) والعقيدات ( Nodules ) والندب ( Scars ) وهذه تظهر في الحالات الشديدة والحادة لحب الشباب ( Webster, ٢٠٠٢ ) .

يُعزى ظهور حب الشباب إلى عدّة عوامل منها زيادة إفراز مادة الزهم وزيادة التقرن الذي يؤدي إلى انسداد القناة الدهنية ، كما إن الزيادة في إفراز هرمونات الاندروجينات وغزو الأحياء المجهرية يؤدي إلى حصول الالتهاب ( Thiboutot, ٢٠٠٠ ) .

تُعد الأحياء المجهرية الموجبة لصبغة كرام ولاسيما البكتريا اللاهوائية *P. acnes* والهوائية *S. epidermidis* المسبب الرئيس في إحداث الإصابة لكون هذه الجراثيم تمتلك بعض عوامل الضراوة مثل إنزيم اللايبيز ( Lipase ) المهم في تحليل مادة الزهم وتحويله إلى أحماض دهنية حرة ، وكذلك قابليتها على إنتاج إنزيمات أخرى ( Webster, ١٩٩٥ ) .

إن استخدام المضادات الحيوية في علاج حب الشباب له دور في انخفاض معدل الإصابة ، إلاّ أن الاستخدام العشوائي لهذه المضادات الحيوية أدى إلى ظهور سلالات بكتيرية جديدة مقاومة لمعظم المضادات الحيوية المتداولة ( Nishijima *et al.*, ٢٠٠٠ ) . ولقلة الدراسات المحلية التي تناولت دراسة الجانب الوراثي لهذه المقاومة ، فقد هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة مدى علاقة بلازميدات العزلات المذكورة آنفاً بالمقاومة للمضادات الحيوية من خلال تجارب التحول والتحييد . إذ تضمنت الدراسة الموضوعات الآتية :

١. عزل وتشخيص البكتريا المسببة لحب الشباب .
٢. دراسة الحساسية الدوائية لهذه العزلات .
٣. تشخيص بعض عوامل الضراوة .
٤. دراسة المحتوى البلازميدي للعزلات .

# ٢ ـ استعراض المراجع Literatures Review

## ٢ ـ ١ حب الشباب Acne Vulgaris

أول من استخدم مصطلح حب الشباب ( Acne Vulgaris ) هو الباحث فوخس ( Fuchus ) سنة ١٨٤٠ ( Goolamali and Adison, ١٩٧٧ ) . وهو من أكثر مشاكل الجلد شيوعاً بين الشباب ، ولاسيما في سن المراهقة ، إذ يظهر ١٠٠ % في الذكور و ٨٥ % في الإناث ( Stathakis *et al.*, ١٩٩٧; Goodman, ٢٠٠١ ) . من النادر جداً حدوث حالات حب الشباب في الأطفال حديثي الولادة ويسمى Infantile Acne وعادة يختفي عند عمر خمس سنوات ( Mengesha and Hansen, ١٩٩٩ ) ، وقد يظهر بنسبة ضئيلة في كبار السن في العقد السادس والسابع من العمر ( Seukeran and Cunliffe, ١٩٩٨ ) .

تبدأ الإصابة الأولى عادة في أوائل العقد الثاني من العمر ، ويعزى ظهوره في الإناث قبل الذكور إلى حدوث البلوغ مبكراً في الإناث ( Burton *et al.*, ١٩٧١; Kilkenny *et al.*, ١٩٩٨ ) . تظهر شدة الإصابة على أوجها لكلا الجنسين عند سن الثامنة عشرة ، وتكون شدة الإصابة عادة في الذكور اكثر من الإناث ( Brown and Shalita, ١٩٩٨ ) . على الرغم من شيوع حب الشباب في الجنس البشري من ذوي البشرة الفاتحة والداكنة على حد سواء إلاّ أن هناك اختلافات عرقية بارزة في مظاهر هذا المرض ، إذ وجد أن حب الشباب من النوع البسيط ( Mild ) ينتشر بين ذوي البشرة الداكنة أكثر مقارنة بذوي البشرة الفاتحة ، في حين لوحظ أن النوع ذو التكيسات العقيدية ( Cystic Acne ) هو أكثر شيوعاً في ذوي البشرة الفاتحة ، إذ أشارت دراسة أجريت باستخدام تقنية الخزعة الجريبية ( Follicular Biopsy ) لعينات مختلفة من الفدام والحطاطات والبثور من أشخاص ذوي بشرة فاتحة وداكنة إلى وجود التهاب شديد وبنسبة أكبر في عينات ذوي البشرة الداكنة وتبين من خلال الفحص النسيجي للأنسجة المحيطة بمنطقة الالتهاب وجود مادة اللاستين المتحللة والتي تشير إلى شدة الإصابة والالتهاب وذلك لتحرر الإنزيمات المحللة للبروتينات المختلفة من الأحياء المجهرية المتواجدة بموقع الإصابة ( Guttman, ١٩٩٩ ) .

يمثل الوجه والعنق والصدر وأعلى الظهر وكذلك أعلى الذراع الأماكن الرئيسة للإصابة ، وتكون بداية المرض تدريجية إذ يمكن تقسيم الإصابات إلى نوعين :

١. إصابات غير التهابية : وتتضمن الفدام بنوعيه المغلق ( بيضاء الرؤوس ) إذ يصل حجمها تقريبا ٢ ملميتر وهي بقع سطحية ذو لون ابيض ومنه جاءت التسمية . والفدام المفتوح ( سوداء الرؤوس ) يتراوح حجمها بين ٣ - ٥ ملميتر وهي عبارة عن بقع مسطحة أو منبسطة أو مرتفعة قليلاً ذات لون اسود داكن ، ويعزى اللون الأسود لأكسدة التايروسين ( Tyrosine ) إلى الميلانين ( Melanin ) بفعل إنزيم Tyrosinase ( Blair and Lewis, ١٩٧٠; Federman and Kirsner, ٢٠٠٠ ) .
٢. إصابات إلتهابية : وتشمل الحطاطات الالتهابية وهي بقع مرتفعة من الجلد حمراء اللون ومتغايرة في الحجم تتراوح بين ٥ - ٨ ملميتر وتنشأ من الفدام المغلق ، ثم تتكون البثور وهو شكل آخر من الإصابة عبارة عن انتفاخ جلدي مليء بالقيح ذي لون اصفر ، وكِلا الشكلين مرتبطان بالالتهاب السطحي أو العميق ، أما العُقيدات فهي عبارة عن كتلة متجمعة عميقة تحت الجلد ، بينما تشير الأكياس إلى عقيدات حطاطية كبيرة الحجم بيضاء اللون ( Kligman, ١٩٧٩; Brown and Shalita, ١٩٩٨; Thiboutot, ٢٠٠٠; Rudy, ٢٠٠٣; Taylor and Shalita, ٢٠٠٤ ) .

يرافق بعض أنواع حب الشباب أعراض جانبية بارزة ، كارتفاع درجة الحرارة وآلام المفاصل ولاسيما عند وجود أكياس وبثور عميقة وتحدث الحكة ( Itching ) في حالات نادرة وتكون مصاحبة لبعض أنواع العلاج التي تسبب الحساسية نتيجة لإنتاج الهستامين ( Yee and Cunliffe, ١٩٩٤; Chan and Rohr, ٢٠٠٠ ) .

قدمت الأكاديمية الأمريكية لعلم الأمراض الجلدية تقسيماً تصنيفياً لحب الشباب عام ١٩٩٠ ويشمل ثلاث مستويات ، الأول يسمى البسيط ( Mild ) إذ يتميز بوجود عدد قليل من الحطاطات والبثور بدون عُقيدات ، أما النوع الثاني فيسمى المتوسط ( Moderate ) ويتميز بوجود عدد من الحطاطات والبثور وعدد قليل من العقيدات ، والنوع الثالث هو الحاد ( Sever ) ويتميز بوجود أعداد كبيرة من الحطاطات والبثور والعقيدات ( Pochi *et al.*, ١٩٩١ ) . كما اقترح الباحث Webster ( ٢٠٠٢ ) تصنيف آخر ، يعتمد على نوع الإصابة ( Type of Lesion ) ، ويتضمن :

١. حب الشباب الفدامي ( Comedonal Acne ) .
٢. حب الشباب الحطاطي – البثوري – البسيط ( Mild Papulopustular Acne ) .
٣. حب الشباب الحطاطي – البثوري – الحاد أو العُقيدي ( Sever Papulopustular or Nodular Acne ) .

لحب الشباب تأثير نفسي واجتماعي شديد على المصاب ، ولاسيما إذا كان من النوع الشديد إذ يترك آثاراً وندباً مشوهة للوجه ، مسبباً بذلك الكآبة والانطواء والخجل وحتى البطالة ، وفي بعض الأحيان الانتحار ( Brown and Shalita, ١٩٩٨; Jappe, ٢٠٠٣ ) ، إذ سُجل هذا المرض كثاني أعلى مسبب للانتحار ( Gupta and Gupta, ١٩٩٨ ) .

## ٢ – ٢ الإمراض وأسباب نشوء المرض Aetiology and Pathogenesis

تزداد نسب الهرمونات الذكرية في الذكور والإناث على حد سواء في مرحلة البلوغ وتلعب هذه الهرمونات الموجودة بشكل طبيعي دوراً مساعداً في زيادة حجم الغدة الدهنية ومن ثم إلى زيادة نشاطها ، لذلك من النادر الإصابة بحب الشباب قبل البلوغ . هذه الهرمونات تحفز الغدد الدهنية في الجلد لكي تبدأ في النمو والاتساع . تتواجد هذه الغدد بكثافة في الوجه والصدر وأعلى الظهر إذ تصل تقريباً إلى ٩٠٠ غدة لكل سم$^{٢}$ ، وهي الأماكن الأكثر عرضة لمرض حب الشباب ، بينما تصل كثافتها في بقية أنحاء الجسم إلى اقل من ١٠٠ غدة لكل سم$^{٢}$ ( Goodman, ٢٠٠١ ) .

تتصل الغدة الدهنية في الجلد بما يسمى بصيلة ( حويصلة ) الشعرة ، ومن خلال هذه البصيلة تستطيع الغدة الدهنية إيصال إفرازها إلى سطح الجلد . يتسبب إفراز الدهن في تساقط الخلايا التي تبطن بصيلة الشعر من الداخل بصورة أسرع من المعتاد ، مما يؤدي إلى التصاقها وتجمعها معاً مكونّة ما يشبه السدادة عند فتحه بصيلة الشعر على سطح الجلد ، مما يوفر ظروفاً لاهوائية ملائمة لنمو البكتريا اللاهوائية وتكاثرها وخاصة بكتريا *P. acnes* على هذا الخليط من الإفراز الدهني والخلايا الكيراتينية المتجمعة في داخل بصيلة الشعر ، عند ذلك يحدث التهاب موضعي نتيجة إفراز إنزيم محلل الدهن ( Lipase ) من قبل *P. acnes* والذي يحلل الدهن إلى كليسرول وأحماض دهنية حرة ، إذ تسبب هذه الأحماض في زيادة فعالية تكوين الفدام وبداية الالتهاب ( Shalita and Lee, ١٩٨٣ ) ، فضلاً عن ذلك تطلق *P. acnes* عوامل جذب كيمياوية ( Chemotactic Factors ) ذات أوزان جزيئية واطئة فعّالة حياتياً ( Puhvel and Sakamato, ١٩٧٨; Kerkemeyer, ٢٠٠٥ ) ، إذ تجذب

الخلايا البيض العَدِلة (Neutrophiles ) والخلايا اللمفاوية ( Lymphocytes ) والبلعم الكبير ( Macrophage ) وتبدأ عملية الاستجابة المناعية غير المتخصصة ، مما ينتج عنها تمزق البصيلة وتسرب البكتريا والخلايا الكيراتينية المتساقطة والمواد الدهنية إلى داخل الجلد في طبقة الأدمة ، مسببة الاحمرار والتورم وأخيراً الالتهاب ، إذ يظهر بشكل حطاطات أو بثور أو عقيدات ( Kligman, ١٩٧٩; Webster, ١٩٩٥ ) .

ويمكن تلخيص العوامل التي تسبب الالتهاب المزمن لحويصلات الدهن للشعر بما يأتي :

## ٢ ـ ٢ ـ ١ زيادة افراز الزهم Increased Sebum Production

الزهم هو المادة الدهنية الغنية التي تفرز من الغدد الدهنية ولها دور أساس في إحداث المرض ، إذ يوفر بيئة غذائية جيدة لنمو الأحياء المجهرية وتكاثرها ولاسيما اللاهوائية منها والمتواجدة بصورة طبيعية في الجلد كبكتريا *P. acnes* ( Level and Marks, ١٩٩٠; Brown and shalita, ١٩٩٨; Taylor and Shalita, ٢٠٠٤ ) .

تشير عدة دراسات إلى إن زيادة معدلات إفراز الزهم في المصابين أكثر من الأصحاء ، وتعتمد شدة حب الشباب نسبياً على الكميات الكبيرة للزهم المنتجة من الغدة الدهنية ( Pochi and Strauss, ١٩٦٤; Jappe, ٢٠٠٣ ) ، كما أشار Thiboutot ( ١٩٩٧ ) إلى إنه لا يمكن حدوث الإصابة بدون إفراز مادة الزهم ولكن ليست بالضرورة أن تكون هي السبب الوحيد في حدوث المرض .

## ٢ ـ ٢ ـ ٢ التقرن المفرط للحويصلة Follicular Hypercornification

يُعد التقرن المفرط للخلايا الطلائية المبطنة لحويصلة الشعر ، وانسداد قناتها من أحد الأسباب المهمة في حدوث المرض ، إذ تتضمن العملية تكاثراً خلوياً ( Cellular Proliferation ) لخلايا مولدة الكيراتين الحوصلي ( Follicular Keratocyte ) وتجمع خلايا الكيراتين في فراغات الحويصلة المؤدية إلى انسداد قناة وحدة الدهن للشعر ، ومن ثم عدم قدرة مادة الزهم على الخروج مما يسبب اتساع الجزء السفلي للحويصلة مؤدية بذلك إلى الانتفاخ ( Holmes *et al.*, ١٩٧٢; Ingham *et al.*, ١٩٩٢; Guy and Keatey, ١٩٩٨; Thiboutot, ٢٠٠١ ) . وقد أشار Webster ( ٢٠٠٢ ) إلى أن ميكانيكية التقرن المفرط ما زالت مبهمة وغير واضحة .

## ٢ ـ ٢ ـ ٣ هرمون الاندروجين Androgen Hormone

تقع سيطرة فعالية الغدة الدهنية تحت تأثير الغدة النخامية ، والغدة الدهنية هي العضو الهدف والحساس للهرمونات الذكرية ( الاندروجينات ) ومنها على وجه الخصوص هرمون التستوستيرون ( Testosterone ) إذ إن الفعالية العالية للغدة سوف يزيد من تحويل هذا الهرمون إلى مركبات أكثر فاعلية مثل Dihydrotestosterone بواسطة إنزيم reductase – α – ٥ الموجود في الغدة الدهنية مما يؤدي إلى تضخم خلايا الغدة ومن ثم زيادة إفراز مادة الزهم ( Blauer *et al.*,١٩٩١, Choudhry *et al.*, ١٩٩٢; Thiboutot *et al.*, ٢٠٠٠; Thiboutot, ٢٠٠١ ) .

## ٢ ـ ٢ ـ ٤ الأحياء المجهرية Microorganisms

لقد أولى الباحثون اهتماماً كبيراً بالدور الامراضي للأحياء المجهرية المتواجدة طبيعياً في جسم الإنسان خلال السنين الأخيرة ، فمعظمها انتهازية ( Opportunistic ) ، مما يُشكل خطورة من تحويلها إلى ممرضة عند توفر الظروف الملائمة لذلك (Baird – Parker, ١٩٧٤; Kloos and Musselwhite, ١٩٧٥ ) .

بصورة عامة توجد ثلاث مجموعات رئيسة من الأحياء المجهرية المتواجدة معاً في حويصلات وحدة الدهن الطبيعية في الجلد الطبيعي وتشمل البكتريا متعددة الأشكال اللاهوائية مثل أنواع بكتريا *Propionibacterium* spp. والمكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. والمجموعة الثالثة هي الفطريات الشبيهة بالخمائر المحبة للدهون وتشمل *Pitytrosporium* spp. فضلاً عن وجود أنواع متفاوتة وبأعداد قليلة موجبة وسالبة لصبغة غرام (Webster, ٢٠٠٢; Jappe, ٢٠٠٣ ) .

## ٢ ـ ٣ العوامل المؤثرة في تفاقم حب الشباب

### ٢ ـ ٣ ـ ١ عوامل الوراثة Heredity Factors

لوحظ في كثير من الحالات أن المصاب بحب الشباب ينحدر من أبوين كان قد أصيب أحدهما أو كلاهما بالمرض ( Goulden *et al*., ١٩٩٩ ) ، كما وجد استعداد خاص للإصابة بالمرض لدى بعض الأسر من خلال الكثير من الدراسات المتعلقة بنسبة التطابق بين التوائم المتماثلة ، فقد لوحظ وجود نسبة عالية من التماثل في زيادة معدلات إنتاج الزهم وتماثل في شدة حب الشباب ( Darley *et al*.,١٩٧٨; Palatsi and Oikarinena, ١٩٧٩; Gonzalez *et al*., ١٩٨٥; Swale *et al*.,١٩٩٨ ) .

### ٢ ـ ٣ ـ ٢ عوامل التغذية Dietary Factors

اعتُقد سابقاً وجود علاقة بين ظهور حب الشباب ونوع معين من الغذاء مثل الشيكولاتة والمشروبات الغازية والمأكولات الدسمة الغنية بالدهون وغيرها ، لكن لا توجد أية أدبيات علمية تؤكد ذلك وان هذا الاعتقاد ربما يعود إلى العامل النفسي ( Nguyen and Alyssa, ١٩٩٤; Kerkemeyer, ٢٠٠٥ ) .

### ٢ ـ ٣ ـ ٣ الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Radiation

لوحظ في كثير من الحالات عند التعرض لأشعة الشمس في جو حار وجاف يحدث تحسن في الأشخاص المصابين ، إذ إن لأشعة الشمس دوراً في إزالة الطبقة الكيراتينية العليا المسببة لضيق أو إغلاق القناة الدهنية بينما تعمل الأشعة فوق البنفسجية على قتل البكتريا المتواجدة في الغدد الدهنية وذلك لقدرتها على اختراق البشرة العليا والسفلى ( Kjeldstal, ١٩٨٤ ) ، ولكن التعرض للشمس الطبيعية لأوقات طويلة ومستمرة ( الحمامات الشمسية ) وكذلك المعالجة بالأشعة فوق البنفسجية ( U.V ) في جلسات طويلة تؤدي إلى الشيخوخة المبكرة للجلد كما تعمل على زيادة انسداد ثقوب الجلد لذلك تكون عديمة الفائدة وتزيد الحالة سوءاً من خلال زيادة فعالية تكوين الفدام لمادة الزهم ( Mills and Kilgman, ١٩٧٨; Sigurdsson *et al*., ١٩٩٧; Cunliffe and Goulden, ٢٠٠٠ ) .

### ٢ ـ ٣ ـ ٤ التعرق Sweating

هناك تأثيرات سيئة لبعض المهن على حالات حب الشباب ولاسيما العاملين بالمطابخ والمغاسل والمناجم ، إذ يسبب العرق الغزير في سد فتحات الجلد ( المسام ) مما يزيد من فعالية تكوين الفدام للزهم ( Williams *et al.*, ١٩٧٤; Kerkemeyer, ٢٠٠٥ ) .

## ٢ ـ ٣ ـ ٥ المواد الكيمياوية والعلاجات Drugs and Chemicals

تحتوي مستحضرات التجميل على الكثير من المواد الكيمياوية التي تستحث حب الشباب وتزيده سوءاً ، وتشمل هذه المستحضرات الزيوت ( Oils ) والدهون ( Greases ) ومساحيق الوجه ( Make up ) والصبغات الموجودة ضمن الكريمات ورشاش الشعر ( Hair Spray ) وغيرها من المستحضرات التجميلية المستخدمة ، إذ تسبب تفاقم الإصابة من خلال زيادة فعالية تكوين الفدام لمادة الزهم ( Guldager, ١٩٨٧; Nguyen and Alyssa, ١٩٩٤ ) .

وتسبب بعض العلاجات الطبية تهيجاً واستحثاثاً لحب الشباب كتأثيرات جانبية سيئة لها ، ولاسيما العلاجات المستخدمة في الطب النفسي الحاوية على الليثيوم ، وعلاجات الستيرويدات الابتنائية ( Anabolic Steroids ) مثل ( Danazol ) و ( Testosterone ) وكذلك الأدوية المضادة للنوبات القلبية ( Dilantin ) مثل ( Phenytoin ) وكذلك فيتامين $B_{١٢}$ (Zaenglein and Thiboutot, ٢٠٠٣; Feldman *et al.*, ٢٠٠٤) .

## ٢ ـ ٣ ـ ٦ الإجهاد Stress

يسبب الإجهاد وقلة النوم وتعرض الإنسان لأزمات نفسية في زيادة تكوين حب الشباب ، من خلال الزيادة في مستويات الهرمونات ومنها الاندروجينات والكورتيزول ، إذ تعمل هذه الهرمونات على زيادة إنتاج وإفراز مادة الزهم المسبب لحب الشباب ( James, ١٩٧٥; Melntosh *et al.*, ١٩٩٨ ) .

# ٢ ـ ٤ البكتريا المسببة لحب الشباب

## ٢ ـ ٤ ـ ١ البربيونيبكتريا Propionibacteria

عرفت هذه البكتريا أولاً باسم *Bacillus acnes* في المصادر الطبية القديمة ، وصفت لأول مرة من الباحث Unna سنة ١٨٩٦ عند تحضيره مقطع نسيجي لعينة من فدام العّد Acne Comedone ، أول من زرعها بنجاح من مكونات البثور هو Saboured سنة ١٨٩٧ ، وقد ذكر بأن خلايا *B. acnes* تشبه بكتريا *Corynbacterium* من حيث المظهر الخارجي والشكل وسميت بهذا الاسم ( Douglas and Gunter, ١٩٤٦ ) .

اقترح الباحث Orlal-Jensen تغير اسمها من *Corynbacterium* إلى *Propionibacterium* بسبب إنتاجها كميات كبيرة من حامض البربيونيك ( Propionic Acid ) وبسبب نموها في ظروف لاهوائية (Johnson and Cummus, ١٩٧٢ ) .

إن بكتريا *Propionibacterium* متغيرة الأشكال يتراوح قطرها بين ٠.٥ – ٠.٨ مايكرون وطولها بين ١ – ٥ مايكرون ، تتخذ أشكالاً مختلفة ، فبعضها عصوي أو كروي أو متفرعة ، تكون الخلايا منفردة أو متجمعة أو بشكل أزواج أو بشكل سلاسل قصيرة وغالباً ما تترتب ما يشبه الحرف Y أو الحرف V أو ما يشبه الحروف الصينية . موجبة لصبغة كرام ،

غير متحركة ، غير مكونة للسبورات ، ذات تغذية عضوية – كيمياوية ، إذ تستطيع إنتاج كميات كبيرة من حامض البربيونيك وحامض الخليك ( Acetic Acid ) وكميات قليلة من حامض آيسوفاليريك ( Isovaleric Acid ) كذلك تُنتج الحوامض الفورميك ( Formic Acid ) والسكسنيك ( Succinic Acid ) واللاكتيك ( Lactic Acid ) وتحرر ثاني اوكسيد الكربون ( Sneath *et al.*, ١٩٨٦; Holt *et al.*, ١٩٩٤ ) . معظم سلالاتها موجبة لفحص الاندول ومحللة للجيلاتين ( Voss, ١٩٧٠ ) . موجبة لفحص الكاتاليز ، سالبة لفحص اليوريز ، قادرة على تحويل النترات ( $NO_3$ ) إلى نتريت ( $NO_2$ ) ، سالبة لتحلل النشا ، موجبة لفحص المثيل الأحمر ، محللة للدم من نوع بيتا ، تخمر الكلوكوز والفركتوز وتحلل الكليسرول ، بينما لا تخمر المالتوز والسكروز والارابينوز ( Wayne *et al.*, ١٩٦٧ ) . تستطيع النمو بمدى حراري يتراوح بين ٣٠ – ٣٧ °م ورقم هيدروجيني يتراوح بين ٤.٥ – ٥ . مستعمراتها على أكار الدم ذات شكل مُحدّب صفراء أو برتقالية وفي بعض الأحيان ذات لون رمادي ( Holt *et al.*, ١٩٩٤ ) .

تُسبب *P. acnes* الكثير من الأمراض أهمها : التهاب الوريد الخثري القيحي السطحي عند الأطفال ( Superficial Suppurative ) وتصيب شغاف القلب ( Endocarditis ) ، والخُراجّات الدماغية ( Cerebral Abscesses ) ، والتهاب المفاصل ( Arthritis ) والتهاب العظام ( Osteomyelitis ) وكذلك التهاب السحايا ( Meningitis ) ( Brook and Frazier,١٩٩١; Funke *et al.*, ١٩٩٧; Tunney *et al.*, ١٩٩٩ ) .

تُنتج *P. acnes* الكثير من الإنزيمات وتشمل Protease و Hyaluronidase و Neuraminidase و Ribonuclease و Liecithinase و Phosphatase Acid وكذلك Lipase ( Leyden *et al.*, ١٩٨٣; Greenman *et al.*,١٩٨٣ ) .

يُقسم نوع *P. acnes* إلى نمطين هما I و II اعتماداً على التغاير في مستضدات الجدار الخلوي ، وتعد ممرضات انتهازية . استخدمت عدة تقنيات للتميز بين النمطين I وII منها التألق المناعي ( Immunofluorescence ) مع الضد وحيد النسيلة ( Monoclonal antibodies (MAbs) ) وكذلك اعتمد التحليل الوراثي المظهري للتسلسل النيوكليوتيدي وعلاقته بـ ١٦s rRNA ( Eady and Johnson, ١٩٩٤; McDowell *et al.*, ٢٠٠٥ ) .

## ٢ – ٤ – ٢ المكورات العنقودية Staphylococci

أطلقت تسمية العنقوديات لانقسام خلاياها في أكثر من اتجاه واحد مكونة عناقيد غير منتظمة وبقائها متجمعة مع بعضها البعض ، فهي كروية الشكل ، موجبة لصبغة كرام ، غير متحركة ، غير مكونة للسبورات وتوجد غالبا بشكل أزواج أو رباعيات يتراوح قطرها بين ١.٥ – ٠.٥ مايكرون ، اختيارية لاهوائية ، موجبة لفحص الكاتاليز ، تنمو ضمن مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح بين ١٤ – ٤٠°م ، وكذلك تتحمل النمو في مدى ملحي يتراوح بين ١٥ – ٧.٥ % . يُعد جنس المكورات العنقودية من الأجناس الواسعة الانتشار ، إذ تتواجد على الجلد وفي الغدد الجلدية والاقنية المعوية . تنتج الكثير من الإنزيمات مثل Esterase و Protease و Deoxyribonuclease و Coagulase و Phospholipase و Lipase ( Kloos and Schleifer, ١٩٧٥;Christensen *et al.*, ١٩٨٣;Sneath, *et al.*, ١٩٨٦ ) .

تقسم المكورات العنقودية إلى قسمين رئيسين :

مكـــورات منتجـــة لإنـــزيم Coagulase الـــذي يســـبب تخثـــر بلازمـــا الـــدم وتســـمى ( Coagulase Positive Staphylococci (COPS ) والتـــي تضـــم *S. aureus* وهي ممرضة ومكونة للقيح ، ومكورات عنقودية غير منتجة لهذا الانزيم وتسمى ( Coagulase Negative Staphylococci (CONS ) مثل *S. epidermidis* وهي من الممرضات الانتهازية ، إذ توجد كجزء من الأحياء المجهرية المتعايشة طبيعيا في جسم الإنسان .

تُعد بكتريا *S. epidermidis* من أكثر الأنواع انتشاراً على الجلد ، وتعد المسبب الرئيس لحب الشباب بعد جنس *P. acnes* ( Burkhart, ٢٠٠٣ ) ، إذ لها القدرة على اختراق دفاعات الجسم والتكاثر وإحداث مختلف الإصابات ( Muller *et al.*, ١٩٩٣ ) ، فضلاً عن امتلاكها عوامل تزيد من ضراوتها ، ومقاومتها للمضادات الحيوية جعلها مسبباً للكثير من الإصـــابات فـــي الإنســـان إذ تســـبب بعـــض ســـلالاتها التهـــاب الصـــمام القلبـــي ( Heart Valve ) والتهاب الأذن الوسطى ( Otitis Media ) والتهاب القناة البولية ( Urinary Tract Infection ) والتجرثم الدموي ( Bacteremia ) وكذلك إصابات الجروح المختلفة ( Variety Wound Infection ) ( Pfaller and Herwaldt, ١٩٨٨; Kloos and Bannerman, ١٩٩٤; Ruppy and Archer, ١٩٩٤ ) .

أما بكتريا *S. aureus* فتُعد من الأجناس الغنية عن التعريف في إحداث مختلف الإصابات وذلك لامتلاكها الكثير من عوامل الضراوة التي تمكنها من اختراق أنسجة الجسم المختلفة ، فضلاً عن مقاومتها المتعددة لأغلب المضادات الحيوية ، إذ تمتلك هذه البكتريا أكثر من ١٨ عامل ضراوة تكون مسؤولة عن إحداث الحالات المرضية وتتضمن هذه العوامل عدداً مـن الإنزيمـات والـذيفانات وعوامـل متعلقـة بالتركيـب المعقّـد لجـدار خليـة *S. aureus* ( Kloos and Schleifer, ١٩٧٥; Jawetz *et al.*, ١٩٩٨ ) .

تُسبب بكتريا *S. aureus* عدداً من الاخماج السطحية ( Superficial Infections ) وتشمل بثرات الجلد ( Skin Pustules ) والتهاب ملتحمة العين ( Conjunctivitis ) واخماج الحروق ، فضلاً عن دورها في تفاقم الإصابة بحب الشباب وتطورها (Higaki *et al.*,١٩٩٧) . وتسبب بكتريا *S. aureus* الكثير من الإصابات القيحية الحادة والخراجات تحت الجلدية وتحت المخاطية ( Subcutaneous and Submucous Abscesses ) ، كذلك تسبب التهاب المفاصل ( Arthritis ) والتهاب العظام ( Osteomyelitis ) والتهاب الكلية والحويضة ( Pyelonephritis ) والتهاب الأوعية اللمفية ( Lymphangitis ) والتهاب العقد اللمفية ( Lymphadenitis ) والتهاب شغاف القلب ( Endocarditis ) وتجرثم الدم ( Bacteremia ) وتســـمم الـــدم ( Septicemia ) والتســـمم الغـــذائي الســـتافيلي ( Staphylococcal Food Poisoning ) ( Cruickskank *et al.*, ١٩٧٥; Sheagren,١٩٨٤; Goldenberg and Reed,١٩٨٥; Sneath *et al.*,١٩٨٦; Holt *et al.*, ١٩٩٤; Jawetz *et al.*, ١٩٩٨ )

## ٢ ـ ٥ عوامل الضراوة Virulence Factors

هنالك عدّة عوامل تضمن للبكتريا القابلية على إحداث الإصابة وتسمى عوامل الضراوة ( Virulence Factors ) ، إذ تنتج البكتريا المسببة لحب الشباب بمختلف أنواعها الكثير من عوامل الضراوة ، وهذه العوامل إما أن يكون لها دور مباشر أو غير مباشر في إحداث الإصابة ، ومن هذه العوامل هي :

### ٢ ـ ٥ ـ ١ الهيمولايسين Haemolysin

يُعرّف الهيمولايسين بأنه تحلل كريات الدم الحمراء بسبب إفراز البكتريا لذيفانات خارجية ( Exotoxins ) أو بسبب إنزيمات حالّة ، وإنتاج الهيمولايسين من الخلية البكتيرية يكون خلال الطور اللوغاريتمي للنمو ( Dassy *et al.*, ١٩٩٣ ) .

إن الموروثات المشفّرة لإنتاج الهيمولايسين قد تكون محمولة كروموسومياً أو محمولة على البلازميدات ، وهذه البلازميدات إما اقترانية ( Conjugative Plasmids ) أو بلازميدات غير اقترانية ( Non – Conjugative Plasmids ) ( Hull *et al.*, ١٩٨٢ ) .

تُنتج الأنواع البكتيرية *S. aureus* و *S. epidermidis* و *P. acnes* الهيمولايسين من نوع بيتا ( β-Hemolysin ) والذي يتحلل فيه الدم بشكل كامل مع ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات ( Wayne *et al.*, ١٩٦٧; Sneath *et al.*, ١٩٨٦ ) فضلاً عن قدرة بعضها على إنتاج أنواع أخرى من التحلل ، إذ أشار Sneath وجماعته ( ١٩٨٦ ) إلى قدرة *S. aureus* على إنتاج أربعة أنواع من التحلل وهي بيتا ( Beta ) ، ألفا ( Alpha ) ، كاما ( Camma ) ودلتا ( Delta ) وجميعها ذيفانات خارجية ( Exotoxins ) ، في حين أشار Males وجماعته ( ١٩٧٥ ) إلى قدرة *S. epidermidis* على إنتاج نوع دلتا من التحلل والذي يُسبب تحلل الخلايا وتسممها ( Lytic and Cytotoxic Activity ) .

## ٢ ـ ٥ ـ ٢ إنزيم محلل الدهون Lipase

يُفرَز هذا الإنزيم من العديد من الأحياء المجهرية ( Sneath *et al.*, ١٩٨٦ ) ، ويُعد أحد عوامل الضراوة المُفرَزة من الأنواع البكتيرية *S. aureus* و *S. epidermidis* و *P. acnes* ( Ingham *et al.*,١٩٨١; Hedstrom and Nilsson-Ehle, ١٩٨٣; Farrell *et al.*,١٩٩٣ ) ، إذ يعمل هذا الإنزيم على تحليل مادة الزهم ( كليسيرويدات ثلاثية ) التي تستفاد منها البكتريا كمادة غذائية لتنتج الكليسيرول والأحماض الدهنية الحرة ، التي تُسهم بشكل كبير في إحداث المرض مؤدية إلى الالتهابات في طبقة الأدمة .

لقد بين الباحث Longshow وجماعته ( ٢٠٠٠ ) وجود جين ثاني يُشفِّر لإنزيم اللايبيز Lipase ( *gehD* ) فضلاً عن جين آخر يُشفِّر لنفس الإنزيم في بكتريا *S. epidermidis* ، إذ تمتلك هذه البكتريا إنزيمين محللين للدهون مما يمكنها من العيش والتكاثر في أوساط غنية بالدهون كبيئة الجلد ، إذ تشكل النسبة العظمى من بين الأحياء المجهرية المتعايشة طبيعياً في الجلد ، يُقدّر حجم قطعة الدنا المشفرة لإنزيم اللايبيز ( ٢kb ) حيث تُشفَّر إلى الوحدات التركيبية الضرورية للتعبير عن فعالية الإنزيم . ففي دراسة أجراها الباحث Miskin وجماعته ( ١٩٩٧ ) حول *P. acnes* المستوطنة لجلد الإنسان والتي تنتج إنزيم اللايبيز الذي يُشفِّر له جين ( *gehA* ) ويقدر وزنه الجزيئي ( ٣٣KD ) حيث تم استخلاصه وتنقيته وتبين أنه يشبه صفات إنزيم اللايبيز المستخلص من بكتريا *E. coli* الذي يقع تحت سيطرة العاثي $T_7$ .

## ٢ ـ ٥ ـ ٣ المادة المخاطية

تنتج بعض أنواع البكتريا مادة مخاطية ( Slime ) وهي عبارة عن مواد خارج خلوية ( Extracellular Matrix ) مؤلفة من وحدات سكرية غالباً ما تكون أحادية أو متعددة ، إذ وجد أن المادة المخاطية المنتجة من المكورات العنقودية تتكون من سكريات متعددة فقط ( Christensen *et al.*, ١٩٨٢a ) .

أظهرت دراسات المجهر الالكتروني الماسح ( Scanning Electron Microscope ) أن هذه المادة تُنتج بكميات كبيرة في الكثير من سلالات بكتريا *S. epidermidis* ، وتُعد عامل ضراوة لها ، فهي تساعدها بعملية الالتصاق ، إذ تسهل حدوث الإصابة وتؤدي في النهاية إلى إحاطة وتغليف الخلية البكتيرية بعدة طبقات مكونة أغشية رقيقة حيوية تعرف بإسم Biofilm ، حيث تعمل هذه الطبقة كحاجز أو عازل يمنع نفاذ المضاد الحيوي إلى داخل الخلية البكتيرية ويزيد من قابليتها على المقاومة ( Christensen *et al.*, ١٩٨٢b; Knobloch *et al.*,٢٠٠١ ) . لقد بين الباحث Christensen وجماعته ( ١٩٨٣ ) أن بكتريا *S. epidermidis* المنتجة للمادة المخاطية تعد ممرضة انتهازية خطرة من خلال المقاطع النسيجية التي أُخذت من الفئران والجرذان المصابة بالتهاب شغاف القلب الذي تسببه *S. epidermidis* .

## ٢ ـ ٥ ـ ٤ إنزيم البيتالاكتميز β – Lactamase

يُنتج هذا الإنزيم من الكثير من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ( Sanders, ١٩٩٢ ) ، ومن البكتريا المرضية وغير المرضية إذ إن السلالات المنتجة لهذا الإنزيم تقاوم مجموعة مضادات البيتالاكتام المتضمنة البنسلينات والسيفالوسبورينات الحاوية على حلقة البيتالاكتام ( Finch, ١٩٨١; Wiedemann and Tolxdorff – Neutzling, ١٩٨٥ ) .

يعمل هذا الإنزيم على تحليل هذه الحلقة للمضادات الحيوية الحاوية عليها ، إذ يفرز الإنزيم بصورة مباشرة إلى خارج الخلية ( Extracellular ) ويبقى جزء منه مرتبطاً بغشاء الخلية ( Membrane–Bound–β–Lactamase ) ، إذ يعمل الأخير كحاجز لحماية الخلية الهدف من فعل المضاد الحيوي ( Bruns and Kepleler, ١٩٨٧; Livermore,١٩٩٥ ) .

تنتج المكورات العنقودية إنزيم البيتالاكتميز المحمولة على البلازميدات بشكل شائع ، فقد بينت إحدى الدراسات السابقة المتعلقة بهذا الإنزيم لأنواع مختلفة من الأحياء المجهرية إذ شكلت نسب المكورات العنقودية المنتجة له ٩٠ % من بين الأنواع المعزولة ( Wiedemann *et al.*, ١٩٨٩ ) . وأشار Rosdahl وجماعته ( ١٩٨٦ ) إلى قابلية المكورات العنقودية السالبة لإنزيم مختر البلازما على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز المحمولة على البلازميد .

إن الجينات الوراثية المسيطرة على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز هي إما كروموسومية ( Chromosomal–β–Lactamase ) أو محمولة على بلازميدات ( Plasmids Mediated–β–Lactamase ) أو أن تتوسطها العناصر القافزة ( Mediated β–Lactamase Transposable Elements ) ( Bush *et al.*,١٩٩٥ ) .

تُثبِّط بعض المواد الكيمياوية عمل الإنزيم مثل Olivanic Acid و Clavulanic Acid و Tazobactam وكذلك Sulbactam ( Brown *et al.*,١٩٧٦ ) .

## ٢ ـ ٦ مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

## Antibiotic Resistance of Bacteria

لاقت دراسة نمط الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية للبكتريا المسببة لحب الشباب اهتماماً كبيراً من الباحثين ، لما لها من دور مهم وأساسي في تقديم العلاج الفعال والمناسب فهي تخفض أعداد البكتريا وتقلل من التفاعلات الالتهابية ( Leyden *et al.*,١٩٨٠; Leyden and Shalita, ١٩٨٦; Brown and Shalita,١٩٩٨ ) .

أشار Coates وجماعته ( ٢٠٠٢ ) إلى أن معدلات نسب المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في علاج حب الشباب قد ازدادت من ٣٤.٥ % في سنة ١٩٩١ إلى ٦٤ % في سنة ١٩٩٧ ، ثم انخفض المعدل إلى ٥٠.٥ % في سنة ١٩٩٩ وارتفع مرة أخرى إلى ٥٥.٥% في سنة ٢٠٠٠ . وفي دراسة أجراها في اليابان Nishijima وزملاؤه ( ٢٠٠٠ ) حول نمط الحساسية لبكتريا *S. epidermidis* و *P. acnes* المعزولتين من مرضى مصابين بحب الشباب تجاه ٩ أنواع من المضادات الحيوية ، سجلت *S. epidermidis* أعلى نسبة مقاومة للمضادات الحيوية مقارنة ببكتريا *P. acnes* . كما أشار Nishijima وجماعته ( ١٩٩٤ ) بوجود علاقة بين مقاومة *S. epidermidis* والعلاج المأخوذ سلفاً ، في حين لم يثبت وجود علاقة واضحة بين مقاومة *P. acnes* والعلاج المأخوذ مسبقاً .

تُعد المقاومة للمضادات الحيوية التي تتوسطها البلازميدات من أهم أنواع المقاومة لما تمتلكه من صفة الانتقال من خلية بكتيرية إلى أخرى ومن ثم شيوع المقاومة للكثير من المضادات الحيوية فضلاً عن المقاومة الموجودة أصلاً في تلك السلالات ، لذلك فان مجموعة مضادات البيتالاكتام قد تكون غير مجدية وفاشلة في علاج حب الشباب بسبب إنتاج بعض السلالات البكتيرية لإنزيم β–Lactamase ( Webster, ٢٠٠٢ ) .

بينت نتائج دراسات أخرى ( Lacey,١٩٧٥; Nobel and Naidoo, ١٩٧٨; Cunliffe and Holland, ١٩٨٩ ) أن *S. epidermidis* و *S. aureus* و *P. acnes* أبدت مقاومة لأكثر من مضاد حيوي ، وقد يعود ذلك إلى وجود بلازميدات المقاومة التي تحمل الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحيوية ، إذ تكتسب البكتريا هذه البلازميدات من بكتريا عائدة لنفس النوع أو من أنواع وأجناس أخرى متواجدة معاً في موقع الإصابة .

## ٢ – ٧ المحتوى البلازميدي Plasmid Profile

تعرّف البلازميدات بأنها عناصر وراثية خارج كروموسومية ، لها القدرة على التضاعف بصورة مستقلة عن كروموسوم المضيف وعادة ما تكون أصغر من الدنا الكروموسومي ( Solar *et al.*,١٩٩٨ ) .

تتواجد البلازميدات في الخلايا البكتيرية وتختلف في أحجامها وأوزانها الجزيئية من أقل من واحد كيلو دالتون إلى أكثر من ٢٠٠ كيلو دالتون ، وغالباً ما تُشفّر عن جينات تخدم المضيف ، مثل جينات المقاومة للمضادات الحيوية وإنتاج الهيمولايسين وإنتاج السموم وغيرها من الصفات التي تزيد من ضراوة البكتريا ، وبعض البلازميدات غير قادرة على التعبير عن صفاتها المظهرية إذ تدعى بالبلازميدات المتخفية Cryptic Plasmids ( Clowes,١٩٧٢ ) .

لقد أشار كل من Rehberger و Glotz ( ١٩٩٠ ) إلى احتواء عزلات بكتريا *Propionibacterium* على بلازميدات مختلفة الأحجام تراوحت أحجامها من ٤.٤ - ١١٩ ميكا دالتون .

أما بالنسبة لبكتريا *S. epidermidis* فقد عُزلت منها بلازميدات المقاومة التي تُشفِّر الكثير من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال والمستخدمة طبياً مثل المضاد الحيوي Trimethoprim ومجموعة مضادات البيتالاكتام ، فضلاً عن عزل البلازميد المسؤول عن المقاومة للمعقمات والمطهرات ( Leelaporn *et al.*,١٩٩٤; Leelaporn *et al.*,١٩٩٦; Firth *et al.*, ٢٠٠٠ ) .

كذلك بالنسبة لبكتريا *S. aureus* فهي معروفة بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية ولاسيما مجموعة البيتالاكتام ، فمن أهم البلازميدات التي عزلت من هذه البكتريا التي تحمل محددات المقاومة للبنسلين هي البلازميدات التي تُشفَّر عن إنتاج إنزيم البيتالاكتميز ، علاوة على عزل بلازميد المقاومة لمضاد التتراسايكلين وبلازميد المقاومة للمعادن الثقيلة ( Rush *et al.*,

١٩٦٩; Smith and Novick,١٩٧٢; Lacey *et al*., ١٩٧٤; Gillespie *et al*., ١٩٨٦; Firth *et al*., ٢٠٠٠ ) .

## ٢ ـ ٨ التحول البكتيري Bacterial Transformation

التحول البكتيري هو أحد ثلاث طرق رئيسة تتبادل فيها البكتريا المعلومات الوراثية وهي الاقتران ( Conjugation ) والتوصيل ( Transduction ) والتحول ( Transformation ) .

يمكن تعريف التحول بأنه عملية التقاط أو انتقال مباشر للدنا البكتيري المعزول مختبرياً ، أو المتحرر من خلايا ميتة ، وقد يحتوي هذا الدنا الملتقط على جينات ممكن أن تمنح خلايا المضيف صفات وراثية جديدة ، إذ تعتمد عملية التحول على قابلية الخلية المستلمة على التأهل لاستلام الدنا الغريب ( Lyon and Skurray, ١٩٨٧ ) .

تمتلك بعض الأنواع البكتيرية نظام تحول طبيعي ، في حين بعض السلالات تمتلك القابلية على التحول فقط في حالة وجود عوامل الكفاءة ( Competence Factors ) ( Lindberg *et al*., ١٩٧٢; Lindberg and Novick, ١٩٧٣; Rudin *et al*., ١٩٧٤ ) .

تمتلك جزيئات الدنا بشكلها الفيزياوي المعزول أو الناتج عن تحلل بكتريا أخرى تعيش في البيئة نفسها قابلية الانتقال بالتحول ، إذ إن عملية أخذ الدنا الحر من الخلية يؤدي إلى تغيير في التركيبة الوراثية لها ومنحها صفات إضافية محمولة على تلك القطعة من الكروموسوم أو البلازميد ( Hanahan, ١٩٨٣ ) .

أشارت عدّة دراسات إلى أن بلازميدات بكتريا *S. aureus* و *S. epidermidis* لها القابلية على التواجد في أكثر من مضيف ، إذ تستطيع بكتريا *S. aureus* أن تُعَبِر في خلايا بكتريا *E. coli* و *B. subtilis* ، كما تستطيع بكتريا *S. epidermidis* أن تُعَبِر في خلايا بكتريا *E. coli* و *S. aureus* ( GryCzan *et al*., ١٩٧٨; Tennent *et al*., ١٩٨٥; Vuong *et al*., ٢٠٠٠ ) .

إن الاعتماد على التحول البكتيري مختبرياً قد ساعد على دراسة الصفات المحمولة على البلازميدات مثل صفة المقاومة لمضادات Macrolides, Lincosmide, Streptogramines (MLS)) على البلازميد pE١٩٤ في بكتريا *S. aureus* من خلال تحويل بكتريا *B. subtilis* بهذا البلازميد ( Iordanescu,١٩٧٦; Iordanescu, ١٩٧٧ ) .

## ٢ ـ ٩ تحييد البلازميدات Plasmids Curing

إن تحييد البلازميدات يعرف بأنه فقدان الخلية للبلازميد وذلك بإحداث ضرر في الدنا البلازميدي ، ومنع تضاعفه الذاتي ( Clowes, ١٩٧٢ ) .

يتم التحييد بعدة عوامل منها فيزياوية وأخرى كيمياوية ، إذ استخدمت الحرارة في تحييد بلازميدات *S. aureus* بعد حضنها عند درجة حرارة ٤٢ – ٤٤°م لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة ، وفقدت البلازميدات المسؤولة عن مقاومة التتراسايكلين وإنتاج إنزيم البنسلينيز (Penicillinase ) ( May *et al*.,١٩٦٤ ) . استخدمت كبريتات دودسيل الصوديوم ( Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ) بكثرة في تحييد البلازميدات التي تشفر لإنزيم β–Lactamase في بكتريا *S. aureus* ( Sonstein and Baldwin, ١٩٧٢ ) ومن العوامل الكيمياوية الاخرى المستخدمة في تحييد بلازميدات المكورات العنقودية هي الصبغات مثل صبغة بروميد الاثيديوم (

Ethidium Bromide ) نظراً لقابلية هذه المادة على الانغراس بين سلسلتي الدنا ، وتثبيط عمل إنزيمات تضاعف الدنا وصبغة الاكرفلافين ( Acriflavine ) وكذلك صبغة الاكردين البرتقالية ( Acridine Orange ) التي تعمل على تثبيط إنزيم بلمرة الدنا ( DNA Polymerase ) وإنزيم بلمرة الرنا ( RNA Polymerase ) وتثبيط عمل إنزيمات تضاعف الدنا مما يعيق تضاعف البلازميد ( Mitsuhashi *et al*., ١٩٦٣; Hashimoto *et al*., ١٩٦٤; Bouanchaud *et al*., ١٩٦٩ ) . وفي دراسة سابقة استخدم فيها صبغة الاكرفلافين وصبغة بروميد الاثيديوم لتحييد بلازميدات بكتريا *Propionibacterium* ( Rehberger and Glotz,١٩٩٠ ) . وأشارت عدد من الأدبيات العلمية إلى قابلية بعض المضادات الحيوية في تحييد الخلايا البكتيرية من بلازميداتها مثل Rifampicin و Coumemycin و Novobiocin ( Novick, ١٩٦٩; Jahnston and Richmond, ١٩٧٠ ) .

# ٣ ـ المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## ٣ ـ ١ المواد Materials

### ٣ ـ ١ ـ ١ الأجهزة Equipments

| | |
|---|---|
| ١. ميزان الكتروني حساس | Analytical Electronic Balance (Sartorius – Germany) |
| ٢. موصدة | Autoclave (National / Japan) |
| ٣. نابذ مركزي | Centrifuge (Hermle, Germany) |
| ٤. مجهر ضوئي مركب | Compound Light Microscope (Olympus, Japan) |
| ٥. مجمدة عالية التجميد | Deep Freezer (Idesit / Italy) |
| ٦. جهاز تقطير الماء | Distiller (Ogawa Seiki, Japan) |
| ٧. ميزان الكتروني | Electronic Balance (Mettler Pj ٦٠٠, Italy) |
| ٨. وحدة الترحيل الكهربائي | Electrophoresis Unit (Shndon, scientific Co. LTD England) |
| ٩. حاضنة | Incubator (Gallenkamp, England) |
| ١٠. نابذ مركزي دقيق | Microfuge (Eppendrof – USA) |
| ١١. ماصات دقيقة | Micropipettes (Oxford, USA) |
| ١٢. مرشحات غشائية نبيذة ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ و ٠.٤٥ مايكروميتر | Millipore Filter (Sartorius membrane filter GM bH, W. Germany) |
| ١٣. فرن كهربائي | Oven (Gallenkamp, England) |
| ١٤. جهاز قياس الرقم الهيدروجيني | pH – Meter (Hoeleze & Cheluis K.G. Germany) |
| ١٥. مجهز القدرة | Power Supplier (Bio Rad, Italy) |
| ١٦. نابذ مركزي مبرد | Refrigerated Centrifuge (Baird & Tatlock, England) |
| ١٧. ثلاجة | Refrigerator (Frigidaire, USA) |
| ١٨. حاضنة هزازة | Shaking Incubator (Gallenkamp, England) |
| ١٩. باعث للأشعة فوق البنفسجية | Ultra Violet Transilluminator (San, Gabried, USA) |
| ٢٠. مازج | Vortex (Griffen & George, UK) |
| ٢١. حمام مائي | Water Bath (Memmert, Germany) |

### ٣ ـ ١ ـ ٢ المواد الكيمياوية

| | |
|---|---|
| ١. ألفا – نفثيل أمين | α – Naphthyl Amine (BDH – England) |
| ٢. ألفا – نفثول أمين | α – Nephthol Amine (BioMerieux – France) |
| ٣. ايثانول مطلق | Absolute Ethanol ٩٩٪ (BDH – England) |
| ٤. حامض الخليك | Acetic Acid (BDH – England) |
| ٥. أسيتون | Aceton (Diagnostic international Inc – USA) |
| ٦. أكار – أكار | Agar – Agar (Oxoid – England) |
| ٧. أكاروز | Agarose (Sigma – USA) |
| ٨. كلوريد الباريوم المائي | $BaCl_2 . 2H_2O$ (BDH – England) |

| | |
|---|---|
| ٩. باكتو- تربتون | Bacto – Trypton (Fluka – Switzerland) |
| ١٠. صبغة بروموفينول الأزرق | Bromophenol Blue (BDH – England) |
| ١١. كلوروفورم | Chloroform (BDH – England) |
| ١٢. البلورات البنفسجية | Crystal Violet (Oxoid – England) |
| ١٣. سكر الكلوكوز | D – Glucose (Fluka – Switzerland) |
| ١٤. سكر المالتوز | D – Maltose (Fluka – Switzerland) |
| ١٥. سكر المانيتول | D – Mannitol (Fluka – Switzerland) |
| ١٦. بروميد الاثيديوم | Ethidium – Bromide (Sigma – USA) |
| ١٧. اثلين ثنائي امين – رباعي حامض الخليك | Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) (BDH – England) |
| ١٨. اكياس النمو اللاهوائي | Gas – Pack (Oxoid – England) |
| ١٩. جيلاتين | Gelatin (Fluka – Switzerland) |
| ٢٠. كليسرول | Glycerol (BDH – England) |
| ٢١. حامض الكبريتيك | $H_2SO_4$ (BDH – England) |
| ٢٢. حامض البوريك | $H_3Bo_3$ (Merk, Germany) |
| ٢٣. حامض الهيدرو كلوريك | Hydrochloric Acid (BDH – England) |
| ٢٤. بيروكسيد الهيدروجين | Hydrogen Peroxide (BDH – England) |
| ٢٥. يود | Iodine (BDH – England) |
| ٢٦. كحول آيزوأميلي | Isoamyl Alcohol (BDH – England) |
| ٢٧. كحول ايزوبروبانول | Isopropanol Alcohol (BDH – England) |
| ٢٨. كلوريد البوتاسيوم | KCl (Tabb Labortories – England) |
| ٢٩. فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين | $K_2HPO_4$ (BDH – England) |
| ٣٠. فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين | $KH_2PO_4$ (BDH – England) |
| ٣١. يوديد البوتاسيوم | KI (BDH – England) |
| ٣٢. نترات البوتاسيوم | $KNO_3$ (BDH – England) |
| ٣٣. هيدروكسيد البوتاسيوم | KOH (BDH – England) |
| ٣٤. سكر اللاكتوز | Lactose (Fluka – Switzerland) |
| ٣٥. اللايسوزايم | Lysozyme (BDH – England) |
| ٣٦. سكر المانوز | Mannose (Fluka – Switzerland) |
| ٣٧. احمر المثيل | Methyl Red (Merk, Germany) |
| ٣٨. كلوريد المغنيسيوم | $MgCl_2$ (Tabb Labortories – England) |
| ٣٩. رباعي مثيل –ب- فنيلين ثنائي أمين ثنائي الهيدروكلورايد | *N,N,N,'N'*,-tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride (Fluka – Switzerland) |
| ٤٠. فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين | $Na_2HPO_4$ (BDH – England) |
| ٤١. فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية | $Na_2H_2PO4 . 2H_2O$ (BDH – England) |
| ٤٢. كلوريد الصوديوم | NaCl (BDH – England) |
| ٤٣. هيدروكسيد الصوديوم | NaOH (BDH – England) |
| ٤٤. بارا مثيل امينو بنزلديهايد | Para Methyl Amino Benzaldehde (Fluka – Switzerland) |

| | |
|---|---|
| ٤٥. ببتون | Peptone (Sigma – USA) |
| ٤٦. الفينول الاحمر | Phenol Red (Oxoid – England) |
| ٤٧. السفرانين | Safranine (BioMerieux – France) |
| ٤٨. كبريتات دودسيل الصوديوم | Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) (Fluka – Switzerland) |
| ٤٩. نشا ذائب | Soluble Starch (Fluka – Switzerland) |
| ٥٠. سكر السكروز | Sucrose (Fluka – Switzerland) |
| ٥١. حامض السلفانيلك | Sulfanilic Acid (BDH – England) |
| ٥٢. سكر التريهالوز | Trehalose (Fluka – Switzerland) |
| ٥٣. ترس القاعدي | Trise-Base (Fluka – Switzerland) |
| ٥٤. توين – ٨٠ | Tween – ٨٠ (BioMerieux – France) |
| ٥٥. يوريا | Urea (BDH – England) |
| ٥٦. مستخلص الخميرة | Yeast Extract (BioMerieux – France) |

## ٣ – ١ – ٣ الأوساط الزرعية الجاهزة

| | |
|---|---|
| ١. وسط أساس أكار الدم | Blood Agar Base (Mast – UK) |
| ٢. وسط مرق نقيع الدماغ والقلب | Brain Heart Infusion Broth (Oxoid – England) |
| ٣. وسط أكار الماكونكي | MacConkey Agar (Biolife – Italy) |
| ٤. وسط أكار المانيتول الملحي | Mannitol Salt Agar (Biolife – Italy) |
| ٥. وسط اختبار أحمر المثيل وتكوين الأسيتون | MR – VP Medium (Himedia – Spain) |
| ٦. وسط أكار مولر – هنتون | Muller – Hinton Agar (Oxoid – England) |
| ٧. وسط الأكار المغذي | Nutrient Agar (Himedia – Spain) |
| ٨. وسط المرق المغذي | Nutrient Broth (Fluka – Switzerland) |
| ٩. وسط ماء الببتون | Peptone Water Medium (Oxoid – England) |
| ١٠. وسط سيمون سترات | Simmon Citrate Agar (Oxoid – England) |
| ١١. وسط مرق الثايوغلايكوليت | Thioglycolate Broth (Biolife – Italy) |
| ١٢. وسط الحديد ثلاثي السكر | Triple Sugar Iron Agar (Fluka – Switzerland) |
| ١٣. وسط مرق صويا التربتكيز | Trypticase Soy Broth (Oxoid – England) |
| ١٤. وسط أساس أكار اليوريا | Urea Agar Base (Oxoid – England) |

## ٣ – ١ – ٤ المضادات الحيوية Antibiotics

**جدول ٣ – ١ . المضادات الحيوية المستخدمة**

| ت | المضاد الحيوي* | رمز المضاد | التركيز |
|---|---|---|---|

| | | | | ( µg / disc ) |
|---|---|---|---|---|
| ١ | بنسلين - ج | Penicillin – G | P | **١٠ |
| ٢ | نيومايسين | Neomycin | N | ٣٠ |
| ٣ | تتراسايكلين | Tetracycline | TE | ٣٠ |
| ٤ | كلورومفينكول | Chloramphenicol | C | ٣٠ |
| ٥ | سيفوتاكسيم | Cephotaxime | CTX | ٣٠ |
| ٦ | سيفالكسين | Cephalexin | CL | ٣٠ |
| ٧ | كلندامايسين | Clindamycin | DA | ٢ |
| ٨ | تـــراي ميثبـــريم / سلفاميثاكزازول | Trimethoprim \ Sulfamethxazole | SXT | ١.٢٥ + ٢٣.٧٥ (٢٥) |
| ٩ | امبكلوكس | Ampiclox | AX | ٣٠ |
| ١٠ | ريفامبسين | Rifampicin | Rif | ٥ |
| ١١ | امبيسلين | Ampicillin | Amp | ١٠ |
| ١٢ | لنكومايسين | Lincomycin | L | ٢ |
| ١٣ | دوكسي سايكلين | Doxycycline | DO | ٣٠ |
| ١٤ | أرثرومايسين | Erythromycin | E | ١٥ |
| ١٥ | سبروفلوكساسين | Ciprofloxacine | Cip | ٥ |
| ١٦ | أموكسيسلين | Amoxycillin | Amx | ٢٥ |
| ١٧ | أميكاسين | Amikacin | AK | ٣٠ |
| ١٨ | جنتامايسين | Gentamycin | CN | ١٠ |
| ١٩ | امبنيم | Imipenem | Ipm | ١٠ |

*** جميع المضادات الحيوية المستخدمة مُجهزة من شركة Oxoid .**

**** وحدة دولية ( IU – International Unit ) .**

## ٣ ـ ١ ـ ٥ السلالات القياسية المستخدمة

**جدول ٣ ـ ٢ . السلالات القياسية**

| ت | اسم السلالة | التركيب الوراثي | المصدر |
|---|---|---|---|
| ١ | *E. coli* MM ٢٩٤ | end AI, $Leu^-$, $Pro^-$, $thr^-$, $gal^-$, $Lac^+$, rec $A^-$, $Rif^r$ | قسم التقنيات الاحيائية كلية العلوم – جامعة بغداد |
| ٢ | *E. coli* HB ١٠١ | end AI, hsd $R^-$, $Lac^-$, $thi^-$, $pro^-$, rec $A^-$, $Tc^r$. $Amp^r$, $pBR٣٢٢^+$, $tra^-$ | |

## الرموز :

١. end AI : خالية من الإنزيمات المحللة للدنا الداخلية .
٢. $Leu^-$, $Pro^-$, $thr^-$, $gal^-$, $thi^-$ : الحاجة إلى الليوسين ، البرولين ، الثريونين ، الكالاكتوز والثايمين على التوالي .
٣. $Lac^+$ : القدرة على تخمير سكر اللاكتوز .
٤. $Lac^-$ : فاقدة القدرة على تخمير سكر اللاكتوز .

٥. $recA^-$ : فقدان نظام إعادة الارتباط .
٦. $Rif^r, Amp^r, Tc^r$ : المقاومة للريفامبسين، الأمبسلين ، والتتراسايكلين على التوالي .
٧. $tra^-$ : عدم القدرة على الاقتران .
٨. $hsd\ R^-$ : خالية من أنظمة التقييد .
٩. $pBR٣٢٢^+$ : امتلاك بلازميد pBR٣٢٢ .

## ٣ ـ ١ ـ ٦ المواد المتفرقة ومصادرها

١. بلازما دم إنسان : مصرف الدم / مستشفى الحلة الجراحي .
٢. دم إنسان : مصرف الدم / مستشفى الحلة الجراحي .
٣. كرات زجاجية ( Glass Beads ) : الأسواق المحلية .
٤. لانسيت معقمة: Sterile Lancet (England) .
٥. قالع الفدام : Comedo Extractor (England) .
٦. المرطبان اللاهوائي : Anaerobic Jar (BBL – England) .
٧. شمع البارافين : Paraffin Wax (BDH – England) .
٨. شريط شمعي لاصق : Para Film (BDH – England) .
٩. حليب مبستر : الأسواق المحلية .

## ٣ ـ ١ ـ ٧ المحاليل والدوارئ

**٣ ـ ١ ـ ٧ ـ ١. محلول السكريات الخزنية ( Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥ )**

حضرت محاليل خزنية لكل من السكريات المستخدمة ( كلوكوز ، مانيتول ، مالتوز ، سكروز ، تريهالوز ، لاكتوز ومانوز ) وذلك بإذابة ١ غم من كل سكر على حدة بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٥٠ مليليتر وعقم بالترشيح عبر مرشحات ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م.

**٣ ـ ١ ـ ٧ ـ ٢. محلول ماكفرلاند القياسي Macfarland Solution ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

يتكون هذا المحلول من :

- محلول A : حضر بإذابة ١.١٧٥ غم من كلوريد الباريوم $BaCl_٢$ بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر .
- محلول B : يتكون من ١ % حامض الكبريتيك $H_٢SO_٤$

حضر المحلول القياسي بمزج ٠.٠٥ مليليتر من محلول A مع ٩.٩٥ مليليتر من محلول B مع رج المزيج جيداً ليعطي كثافة تضبيب مساوية ($١.٥x١٠^٨$ cells / ml) أغلقت الأنبوبة بإحكام وحفظت عند درجة حرارة الغرفة مع مراعاة رج المزيج جيداً قبل الاستخدام .

**٣ ـ ١ ـ ٧ ـ ٣. محلول دارئ الفوسفات ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

ويتكون من محلولين :

- محلول A : حضر بإذابة ٣.١٢ غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية ( $Na_٢H_٢PO_٤.٢H_٢O$ ) في ٩٠ مليليتراً من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر .
- محلول B : حضر بإذابة ٢.٨٣٩ غم من فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين ( $Na_٢HPO_٤$ ) في ٩٠ مليليتراً من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر .

مزج ٢٨ مليليتر من محلول A مع ٧٢ مليليتراً من محلول B لغرض تحضير دارئ الفوسفات ذي رقم هيدروجيني ٧.٢ وأكمل الحجم إلى ٢٠٠ مليليتر بالماء المقطر .

**٣ – ١ – ٧ – ٤. محلول بنسلين – ج Penicillin – G ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

حضر المحلول آنياً بإذابة ٠.٦ غم من مسحوق المضاد الحيوي Penicillin – G في ٦٠ مليليتراً من دارئ الفوسفات وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم المحلول بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر إلى داخل قنينة زجاجية معتمة ومعقمة .

**٣ – ١ – ٧ – ٥. محلول النشا الذائب ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

حضر المحلول بتركيز ١ % إذ أذيب ١ غم من مسحوق النشا في ٩٠ مليليتراً من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، مع وضع القنينة في حمام مائي عند درجة حرارة ١٠٠ °م مع الرج لحين ذوبانه تماماً .

**٣ – ١ – ٧ – ٦. محلول اليود ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

حضر المحلول بإذابة ٢.٠٣ غم من اليود Iodine مع ٥.٣٢ غم من يوديد البوتاسيوم KI في ٩٠ مليليتراً من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، حفظ المحلول في قنينة معتمة .

**٣ – ١ – ٧ – ٧. محلول اليوريا ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر بإذابة ٤٠ غم من اليوريا بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم بالترشيح باستخدام أغشية ترشيح دقيقة ٠.٤٥ مايكروميتر لحين الاستعمال .

**٣ – ١ – ٧ – ٨. دارئ SET ( Pospiech and Neuman, ١٩٩٥ )**

حضر من مزج ٧٥ ملي مولار NaCl و ٢٥ ملي مولار EDTA و ٢٠ ملي مولار Tris-OH في كمية مناسبة من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم الدارئ بالموصدة لمدة ١٠ دقائق وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

**٣ – ١ – ٧ – ٩. محلول اللايسوزايم ( ٥٠ ملغم / مل )**
**( Pospiech and Neuman, ١٩٩٥ )**

حضر المحلول آنياً بإذابة ٥٠ ملغم من اللايسوزايم في ١ مليليتر من الماء المقطر المعقم .

**٣ – ١ – ٧ – ١٠. محلول SDS ( ١٠ % ) ( Pospiech and Neuman, ١٩٩٥ )**

حضر المحلول بإذابة ١٠ غم من الـ SDS في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، وسخن المحلول إلى درجة حرارة ٥٥ °م لمدة ٢ – ٣ دقيقة وحفظ عند درجة حرارة الغرفة .

**٣ – ١ – ٧ – ١١ . محلول NaCl ( ٥ مولار ) ( Pospiech and Neuman, ١٩٩٥ )**

حضر بإذابة ٧.٢٧٥ غم من كلوريد الصوديوم NaCl في كمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل إلى ٢٥ مليليتراً ماءاً مقطراً وعقم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

**٣ – ١ – ٧ – ١٢. دارئ TE ( Pospiech and Neuman, ١٩٩٥ )**

حُضر من مزج ١ ملي مولار EDTA و ١٠ ملي مولار Tris-OH في كمية مناسبة من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

**٣ – ١ – ٧ – ١٣. دارئ الترحيل TBE ( Lema *et al.*, ١٩٩٤ )**

حُضر من مزج ٥٠ ملي مولار Tris-OH و ٥٠ ملي مولار Boric Acid و ١ ملي مولار EDTA في كمية مناسبة من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ، أكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر ، عقم بالموصدة لمدة ١٠ دقائق وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

**٣ – ١ – ٧ – ١٤. دارئ التحميل Loading Buffer ( Maniatis *et al.*, ١٩٨٢ )**

حضر الدارئ من ٣ مليليتر Glycerol و ٠.٠٢٥ غم Bromophenol Blue و ٥٠ مليليتراً TBE و ٢ مليليتر ماء مقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر بالماء المقطر ، مزج المحلول جيداً وحفظ في قنينة معتمة ومعقمة عند درجة حرارة ٤ °م .

**٣ – ١ – ٧ – ١٥. محلول كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ ( ٠.١ مولار ) ( Sambrook *et al.*, ١٩٨٩ )**

حضر بإذابة ٠.٣٦٧٥ غم من كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٢٥ مليليتراً ، عقم بالموصدة ثم حفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

**٣ – ١ – ٧ – ١٦. محاليل المضادات الحيوية ( Maniatis *et al.*, ١٩٨٢ )**

حضرت محاليل خزنية ( Stock Solution ) لكل من Penicillin G, Ampicillin ، وبتراكيز ١٠ ملغم / مليليتر ، عقمت بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر ، وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

## ٣ – ١ – ٨ الكواشف والصبغات Reagents and Dyes

**٣ – ١ – ٨ – ١. كاشف كوفاكس Kovac's Reagent ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر الكاشف بإذابة ١٠ غم من بارا مثيل أمينو بنزألديهايد *P*-methyl aminobenzaldehyde في ٥٠ مليليتراً من Amyl Alcohol ، أكمل الحجم إلى ١٥٠ مليليتراً ، أضيف ٥٠ مليليتراً من حامض الهيدروكلوريك المركز بصورة تدريجية إلى المزيج ، خُزن المحلول في قنينة معتمة ورُج بلطف قبل الاستعمال . استخدم هذا الكاشف للكشف عن حلقة الاندول .

**٣ – ١ – ٨ – ٢. كاشف احمر المثيل Methyl Red Reagent ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر الكاشف بإذابة ٠.١ غم من صبغة أحمر المثيل في ٣٠٠ مليليتر من ٩٥ % كحول أثيلي وأكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر من الماء المقطر .

**٣ – ١ – ٨ – ٣. كاشف فوكاس بروسكاور Vogas – Proskaur Reagent ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

يتكون هذا الكاشف من :

- محلول ( A ) : حضر بإذابة ٥ غم من ألفا - نفثول أمين α-Naphthol Amine في كمية مناسبة من الكحول الأثيلي بتركيز ٩٦ % أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ليصبح تركيزه النهائي ٥ %.
- محلول ( B ) : أذيب ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في كمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ليصبح تركيزه النهائي ٤٠ % .

**٣ – ١ – ٨ – ٤. كاشف الاوكسيديز Cytochrome C Oxidase Reagent ( Baron *et al.*, ١٩٩٥ )**

حضر الكاشف آنياً عند الاستخدام في قنينة معتمة ومعقمة بإذابة ٠.١ غم من رباعي مثيل – ب – فنيلين ثنائي الأمين ثنائي الهيدروكلورايد *N,N,N,'N'*-tetramethyl-*p*-paraphenylene diamine dihydrochloride في كمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر .

**٣ – ١ – ٨ – ٥. كاشف اختبار الكاتاليز $H_2O_2$ ( ٣ % ) Catalase Reagent ( Baron *et al.*, ١٩٩٥ )**

حضر الكاشف في قنينة معتمة ومعقمة بإضافة ٧.٥ مليليتر من محلول ٤٠ % بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ إلى ٩٢.٥ مليليتر من الماء المقطر المعقم .

**٣ – ١ – ٨ – ٦. كاشف اختزال النترات Nitrate Reduction Reagent ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

يتكون هذا المحلول من :

- محلول ( A ) : حضر بإذابة ٨ غم من حامض السلفانيلك Sulfanilic Acid في كمية مناسبة من محلول ٥ عياري من حامض الخليك Acetic Acid ، ثم أكمل الحجم إلى لتر .
- محلول ( B ) : حضر بإذابة ٥ غم من ألفا – نفثيل أمين ( α-Naphthyl Amine ) في كمية مناسبة من محلول ٥ عياري حامض الخليك Acetic Acid ، ثم أكمل الحجم إلى لتر .

مزج قبل الاستعمال حجمان متساويان من كِلا المحلولين لتكوين الكاشف .

**٣ – ١ – ٨ – ٧. محلول صبغة أحمر الفينول Phenol Red ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر المحلول بإذابة ٠.٠٥ غم من صبغة أحمر الفينول في ٥ مليليتر من الكحول الأثيلي تركيز ٩٥ % ، ثم أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر بالماء المقطر .

**٣ – ١ – ٨ – ٨. محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide ( Sambrook *et al.*, ١٩٨٩ )**

حضر المحلول الخزين بتركيز ١٠ ملغم / مليليتر بإذابة ٠.١ غم من بروميد الاثيديوم في ١ مليليتر من الإيثانول المطلق ، أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر بالماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة ومعقمة .

**٣ – ١ – ٨ – ٩. صبغة السفرانين ( Hogt *et al.*, ١٩٨٦ )**

حضرت بتركيز ٠.١ % ( وزن / حجم ) .

**٣ – ١ – ٨ – ١٠. محاليل صبغة كرام Gram's Stain Solution ( Brooks *et al.*, ١٩٩٨ )**

حضرت محاليل صبغة كرام وتطبيقها اعتماداً على وفق ما ورد في المصدر أعلاه .

## ٣ – ١ – ٩ الأوساط الزرعية المستخدمة

### ٣ – ١ – ٩ – ١ الأوساط الزرعية الجاهزة

حضرت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة ، بحسب ما أوصت به الشركة المجهزة وكما مثبت على العبوة ، ثم عقمت بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ °م وضغط ١٥ باوند / انج$^{٢}$ لمدة ١٥ دقيقة ، بُرّدت إلى درجة حرارة ٥٠ °م ، وصُبت في أطباق معقمة أو أنابيب معقمة .

### ٣ – ١ – ٩ – ٢ الأوساط الزرعية التركيبية

**١. وسط الثايوغلايكوليت Thioglycolate Broth ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر الوسط وزّع في أنابيب Pigot Tube ، ثم وضع في كل أنبوبة ٤ – ٥ من الكرات الزجاجية ( Glass Beads ) لغرض التكسير ثم عقم بالموصدة .

**٢. وسط السكريات ( Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥ )**

حضر بإذابة ١ غم من الببتون في كمية مناسبة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ٥٠ مليليتراً ، أضيف إليه كاشف أحمر الفينول وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٢ ، عقم بالموصدة ، أضيف إليه محاليل السكريات ( كلوكوز ، مانيتول ، مالتوز ، سكروز ، تريهالوز ، لاكتوز ومانوز ) كلّ على حده ، صب في أنابيب نظيفة معقمة .

**٣. وسط أكار الدم ( Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥ )**

حضر وسط أساس أكار الدم وبرّد إلى درجة حرارة ٤٥ – ٥٠ °م ، أضيف إليه الدم البشري ٥ % ، مُزج جيداً وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة .

**٤. وسط أكار اليوريا ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر وسط أساس أكار اليوريا وبرّد إلى درجة حرارة ٤٥ °م ، أضيف إليه محلول اليوريا ٥ مليليتر ، مزج جيداً وصب في أنابيب نظيفة ومعقمة .

**٥. وسط اختزال النترات Nitrate Reduction Medium ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

حضر بإذابة ٠.٢ غم من نترات البوتاسيوم ( $KNO_3$ ) و ٥ غم ببتون في ٩٥٠ ملليتراً من الماء المقطر ، أذيبت المكونات في حمام مائي وأكمل الحجم إلى لتر ، وزعت في أنابيب اختبار نظيفة وعقمت بالموصدة .

**٦. وسط الجيلاتين Gelatin Medium ( Ray and Robert, ١٩٧٠ )**

حضر بإذابة ١٢٠ غم من الجيلاتين في كمية ٥٠٠ ملليتر من المرق المغذي Nutrient Broth ، أكمل الحجم بالمرق المغذي إلى لتر وسخن عند درجة حرارة ١٠٠ °م وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨.٤ ، وزع في أنابيب نظيفة وعقم بالموصدة . لغرض الزرع اللاهوائي استخدم وسط الثايوغلايكوليت بدلاً عن المرق المغذي .

**٧. وسط تخمر الكلوكوز Glucose Fermentation Medium ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

حضر الوسط بإذابة ١٠ غم من الببتون و ٥ غم من NaCl في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٩٩٠ ملليتر ، أضيف إليه كاشف أحمر الفينول وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٢ وعقم بالموصدة ، أضيف إليه ١٠ ملليتر من محلول الكلوكوز ، وزع الوسط في أنابيب معقمة .

**٨. وسط أكار اللايبيز Lipase Agar Medium ( Harryigan & Mafacne, ١٩٧٦ )**

حضر الوسط بإضافة ١٠ ملليتر من مادة ( ٨٠ – Tween ) في ٩٩٠ ملليتر من الأكار المغذي وعقم بالموصدة .

**٩. وسط أكار الحليب Milk Agar ( Lacey *et al.*, ١٩٧٠ )**

حضر الوسط بإضافة ٢٠٠ ملليتر من الحليب المبستر إلى كمية مناسبة من الأكار المغذي وأكمل الحجم إلى لتر بالأكار المغذي وعقم بالموصدة .

**١٠. وسط لوريا السائل L – Broth ( Maniatis *et al.*, ١٩٨٢ )**

حضر بإذابة ١٠ غم من تربتون Trypton و ١٠ غم من NaCl و ٥ غم من مستخلص الخميرة Yeast Extract بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى لتر ، وزع في أنابيب وعقم بالموصدة .

**١١. وسط SOC : ( Hanahan *et al.*, ١٩٩٦ )**

حضر بإذابة ٢٠ غم Bacto-Trypton و ٥ غم من مستخلص الخميرة Yeast Extract و ١٠ ملليتر من ١ مولاري NaCl ، ٢.٥ ملليتر من ١ مولاري KCl و ١٠ ملليتر من ٢ مولاري $MgCl_2$ بكمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ٩٩٠ ملليتراً ، عقم الوسط بالموصدة وبرد إلى درجة حرارة ٥٠ °م وأضيف إليه ١٠ ملليتر من ٢ مولاري كلوكوز معقم بالترشيح ، وزع في أنابيب نظيفة ومعقمة .

## ٣ – ٢ طرائق العمل Methods

### ٣ – ٢ – ١ جمع العينات

جُمعت ٢١٥ عينة من ١٦٦ مريض من المصابين بحب الشباب من كِلا الجنسين في مستشفى مرجان التخصصي ومركز الحساسية والربو – شعبة الجلدية في الحلة .
تضمنت العينات الفدام ( Comedone ) والبثور ( Pustule ) وأخذت بعد مسح بشرة الوجه ٢ - ٣ مرات بالكحول الأثيلي بتركيز ٧٠ % ، إذ جمعت عينات الفدام بواسطة قالع الفدام ( Comedo extractor ) ، أما البثور فجمعت بوساطة وخزها بلانسيت معقمة ( Sterile Lancet ) ، ووضعت العينات في القناني الحاوية على وسط الثايوغلايكوليت ونقلت إلى المختبر .

## ٣ ـ ٢ ـ ٢ زرع العينات

زُرعت العينات هوائياً على وسطي أكار الدم ووسط الماكونكي بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . وزُرعت لاهوائياً بنقل عروة ناقل من الوسط الناقل إلى مرق الثايوغلايكوليت مضاف إليه ١ % من ٨٠ Tween وحضنت القناني لمدة ٥ – ٧ أيام عند درجة حرارة ٣٧ °م ، ثم نقل مقدار عروة ناقل إلى أكار الدم ، وضعت الأطباق في المرطبان اللاهوائي ( Anaerobic Jar ) لمدة ٢ – ٣ أيام عند درجة حرارة ٣٧ °م .

## ٣ ـ ٢ ـ ٣ تشخيص العينات

أجريت الاختبارات التشخيصية للعزلات قيد الدراسة حسب ما جاء في Sneath وجماعته ( ١٩٨٦ ) و Holt وجماعته ( ١٩٩٤ ) و Jawetz وجماعته ( ١٩٩٨ ) ، وتم الاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية وكما يأتي :

## ٣ ـ ٢ ـ ٣ ـ ١ الصفات المظهرية

شُخصت العزلات تشخيصاً أولياً اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات على الأوساط الزرعية والمتضمنة حجم وحافة وارتفاع ولون المستعمرات ، ثم صبغت الخلايا بصبغة كرام Gram's Stain ولوحظت الصفات المظهرية للخلايا تحت المجهر الضوئي المركّب والمتضمنة شكل ، حجم الخلايا وطريقة تجمعها ونتيجة تفاعل صبغة كرام .

## ٣ ـ ٢ ـ ٣ ـ ٢ الاختبارات الكيموحيوية

**١. النمو على وسط أكار المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

زرعت العزلات على وسط أكار المانيتول الملحي لتشخيص العنقوديات الذهبية المخمرة لسكر المانيتول . تغير لون الوسط إلى الأصفر يُعد نتيجة موجبة .

**٢. اختبار إنزيم مخثر البلازما Coagulase Test ( Collins & Lyne, ١٩٨٧ )**

أضيف ٠.١ مليليتر من المزروع البكتيري بعمر ١٨ ساعة إلى أنبوبة زجاجية معقمة حاوية على ٠.٤ مليليتر من بلازما بشرية وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م وسجلت النتائج كل نصف ساعة إذ يشير تكتل البلازما إلى النتيجة الموجبة .

**٣. اختبار إنتاج إنزيم محلل الدم Hemolysin Test**
**( Cruickshank *et al*., ١٩٧٥ )**

زُرعت البكتريا بأخذ جزء من مستعمرة مفردة نقية بطريقة التخطيط على أكار الدم وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ، إذ إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات دلالة على النتيجة الموجبة .

**٤. اختبار إنتاج إنزيم الكاتاليز Catalase Test**
**( Ray and Robert, ١٩٧٠; Cruickshank *et al*., ١٩٧٥ )**

نقل جزء من مستعمرة فتية بوساطة الناقل على سطح شريحة زجاجية نظيفة ، ثم أضيف لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين ( ٣ % ) ، تكوّن فقاعات هوائية يُعد نتيجة موجبة . أما العزلات اللاهوائية فبعد مدة حضن ٢ – ٣ أيام ، نُقل جزء من مستعمرة مفردة نقية من على وسط أكار الدم إلى شريحة زجاجية وعوملت بالطريقة أعلاه

**٥. اختبار إنتاج إنزيم الاوكسيديز Oxidase Test ( Cruickshank *et al*., ١٩٧٥ )**

نُقل جزء من المستعمرة المراد اختبارها بوساطة عود خشبي معقم ونشرت على ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز ، تحول لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي الغامق خلال ٤ – ٥ ثواني دلالة على النتيجة الموجبة .

**٦. اختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation Test**
**( Ray and Robert, ١٩٧٠; Cruickshank *et al*., ١٩٧٥ )**

لقح وسط اختبار السكريات بالبكتريا المراد تشخيصها وحُضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ، ولاهوائياً عند درجة ٣٧ °م لمدة ٥ – ٧ أيام ، تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر يُعد نتيجة موجبة .

**٧. اختبار الحديد ثلاثي السكر TSI Test ( Cruickshank *et al*., ١٩٧٥ )**

زُرعت العينات على مائل أكار ثلاثي السكر والحديد بطريقة الطعن ثم التخطيط على السطح المائل وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، ظهور فقاعات غازية أو تكوّن راسب أسود أو تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر يُعد نتيجة موجبة .

**٨. اختبار الاندول Indol Test ( Cruickshank *et al*., ١٩٧٥ )**

لُقح وسط ماء الببتون بمزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة وحضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، ثم أضيف ٠.٥ مليليتر من كاشف كوفاكس ( Kovac's Reagent ) إلى الوسط مع الرج الخفيف . تكون حلقة حمراء على سطح الوسط يُعد نتيجة موجبة .

**٩. اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

لقح أكار مائل السترات بمزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة بطريقة التخطيط وحضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة . تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق يُعد نتيجة موجبة .

**١٠. اختبار تكوين الأسيتون Voges Proskaur Test ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

لقح وسط MR – VP بمزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة وحضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، بعد ذلك أضيف ١٥ قطرة من كاشف ألفا – نفثول و ١٠ قطرات من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ( KOH ) إلى كل أنبوبة . ظهور اللون الوردي خلال ١٥ – ٣٠ دقيقة دلالة على النتيجة الموجبة .

**١١. اختبار أحمر المثيل Methyl Red Test ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

لقح الوسط الزرعي MR – VP بمزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة وحضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، بعد ذلك أضيف ٥ قطرات من كاشف أحمر المثيل . ظهور اللون الأحمر في الوسط بعد ١٥ دقيقة دلالة على النتيجة الموجبة .

**١٢. اختبار إنتاج اليوريز Urease Test ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

اجري الفحص بتنمية العزلات على وسط مائل أكار اليوريا بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . تحول لون الوسط من الأصفر إلى الوردي دلالة على النتيجة الموجبة .

**١٣. اختبار اختزال النترات Nitrate Reduction Test ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )**

لقح وسط اختزال النترات بمزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة . ظهور اللون الأحمر في الوسط خلال ٣٠ ثانية دلالة على النتيجة الموجبة .

**١٤. اختبار إنتاج الصبغات Pigments Production Test ( Lacey *et al.*,١٩٧٠ )**

أخذ جزء من مستعمرة فتية بعروة ناقل من مزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة ونشر بالتخطيط على وسط أكار الحليب وحضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة . ظهور مستعمرات ذات لون أصفر ذهبي دلالة على النتيجة الموجبة .

**١٥. اختبار إنزيم اللايبيز Lipase Test ( Harryigan & Mafance, ١٩٧٦ )**

لقح وسط اللايبيز بالبكتريا المراد فحصها وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة . إن ظهور منطقة تحلل شفافة حول المستعمرات دلالة على النتيجة الموجبة .

**١٦. اختبار تخمر الكلوكوز لاهوائياً Anaerobic Glucose Fermentation Test ( MacFaddin, ٢٠٠٠ )**

لقح وسط الكلوكوز بمزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة وغطيت الأنابيب بطبقة من شمع البارافين المعقم المسخن بارتفاع ٢ سم ، ثم حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، تحول لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دلالة على النتيجة الموجبة .

**١٧. اختبار تمييع الجلاتين Gelatin Liquefaction Test**
**( Ray and Robert, ١٩٧٠ )**

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين بالبكتريا المراد فحصها بطريقة الطعن بوساطة الإبرة الناقلة في مركز الوسط . حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة للبكتريا الهوائية ، ولمدة ٥ – ٧ أيام للبكتريا اللاهوائية ، عدم تصلب الجيلاتين بعد حفظه مدة ١٠ دقائق عند درجة ٤ °م دلالة على النتيجة الموجبة .

## ٣ – ٢ – ٤ حفظ وإدامة العزلات

- **الحفظ قصير الأمد ( Harly and Prescott, ١٩٩٦ )**

لقح وسط الأكار المغذي بالعزلات المشخصة وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ثم أحيطت الأطباق بوساطة شريط شمعي لاصق ( Para Film ) . جُمعت الأطباق داخل أكياس معلّمة وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ °م . أما العزلات اللاهوائية فتم تلقيح وسط مرق الثايوغلايكوليت في Pigot Tube وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٥ – ٧ أيام ومن ثم حفظت عند درجة حرارة ٤ °م .

- **الحفظ متوسط الأمد ( Harly and Prescott, ١٩٩٦ )**

لقحت أنابيب مائل الأكار المغذي بالعزلات المراد حفظها مع حضن الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . أُحيطت سدادة الأنابيب بوساطة شريط شمعي لاصق ( Para Film ) وحفظت الأنابيب في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ °م لمدة تتراوح بين ١ – ٤ أشهر .

- **الحفظ طويل الأمد ( Karch *et al.*, ١٩٩٥ )**

لقحت أنابيب حاوية على ١٠ مليليتر من المرق المغذي بـ ٠.١ مليليتر من مزروع بكتيري عمره ٤ ساعات ، حفظت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ، بعدها أُخِذ ١ مليليتر من المزروع البكتيري النامي ونقل إلى أنبوب معقم حاوي على ١ مليليتر من الكليسرول المعقم ، وحفظت عند درجة حرارة - ٢٠ °م لمدة ٦ أشهر . أما العزلات اللاهوائية ، فقد نُقلت مستعمرة بكتيرية إلى مرق الثايوغلايكوليت وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٥ – ٧ أيام . أُخذ مقدار عروة ناقل ولقح به المرق المغذي المضاف إليه ٤٠ % كليسرول . حضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة وحفظت عند درجة حرارة - ٢٠ °م .

## ٣ – ٢ – ٥ اختبار الحساسية الدوائية ( Bauer *et al.*, ١٩٦٦ )

اختبرت حساسية العزلات تجاه عدد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال طبياً والتي استعملت بشكل أقراص جاهزة ، وكما يأتي :

١. حضر عالق بكتيري وذلك بأخذ جزء من مستعمرة مفردة نقية بوساطة عروة ناقل ونقلت إلى وسط المرق المغذي وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢ – ٥ ساعات أو لحين ظهور العكورة .
٢. عدل تركيز الخلايا الجرثومية في الوسط باستخدام أنبوبة ماكفرلاند القياسية ٠.٥ .

٣. زرعت على وسط مولر هنتون الصلب باستعمال مسحة قطنية Cotton Swab مبللة بالعالق الجرثومي وبثلاثة اتجاهات لغرض نشر البكتريا على سطح الوسط والحصول على نمو متجانس .
٤. تركت الأطباق مدة ٣ – ٥ دقائق حتى تجف ، وضعت بعدها أقراص المضادات الحيوية ( ٦ أقراص للطبق الواحد ) باستخدام ملقط معقم وضغطت الأقراص بلطف .
٥. حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك تمت قراءة النتائج بقياس أقطار التثبيط حول أقراص المضادات الحيوية ومقارنتها بالمعدلات القياسية .

## ٣ – ٢ – ٦ اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز ( Collee *et al.*, ١٩٩٦ )

استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة Rapid Iodometric Method في الكشف عن قدرة العزلات قيد الدراسة على إنتاج إنزيم الـ β – Lactamase وكما يلي :

١. حضرت مزارع بكتيرية بعمر ٢٤ ساعة منماة على وسط الأكار المغذي ، نقل جزء من مستعمرة مفردة نقية بوساطة ناقل معقم إلى أنابيب أبندروف حاوية على ٠.١ مليليتر من محلول Penicillin G ، حضنت هذه الأنابيب في ٣٧ °م لمدة ٦٠ دقيقة .
٢. تمت إضافة ٥٠ مايكروليتراً من محلول النشا .
٣. أضيف ٢٥ مايكروليتراً من محلول كاشف اليود ، رجت الأنابيب جيداً لضمان تجانس محتويات الأنبوبة إذ إن تكوّن لون أزرق غامق دلالة على تفاعل اليود مع النشا .
٤. إن التغيير السريع في اللون من الأزرق إلى الأبيض دلالة على النتيجة الموجبة .

## ٣ – ٢ – ٧ الكشف عن إنتاج المادة المخاطية ( Christensen *et al.*, ١٩٨٢a )

زرعت الأنابيب الحاوية على وسط TSB بالبكتريا قيد الدراسة ثم حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٤٨ ساعة . تم التخلص من المزروع البكتيري وأضيف لها صبغة السفرانين وتركت لمدة ١٥ دقيقة ، سُكبت محتويات الأنابيب ووضعت بشكل مقلوب على ورقة ترشيح . اصطباغ الجدران الداخلية للأنابيب باللون الأحمر دلالة على النتيجة الموجبة ، استخدمت في هذه التجربة أنابيب غير ملقحة بالبكتريا كسيطرة سالبة .

## ٣ – ٢ – ٨ استخلاص الدنا البلازميدي ( Pospiech and Neuman, ١٩٩٥ )

اعتُمدت طريقة التمليح الخارجي ( Salting Out ) وكما يأتي :

١. لقح وسط L – Broth بالبكتريا بأخذ جزء من مستعمرة مفردة نقية بوساطة عروة ناقل ، حضنت الأنابيب في الحاضنة الهزازة لمدة ١٨ ساعة ، عند درجة حرارة ٣٧ °م وبسرعة ١٥٠ دورة / دقيقة .
٢. نبذ ٣٠ مليليتر من النمو البكتيري بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ٤ °م ، أهمل الراشح .

٣. عُلقت الخلايا في ٥ مليليتر من دارئ SET وأضيف لها ١٠٠ مايكروليتر من محلول اللايسوزايم مع الرج باستعمال المازج لمدة ١ دقيقة ، ثم حضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ساعة .
٤. أضيف ٦٠٠ مايكروليتر من محلول SDS ثم حضنت عند درجة حرارة ٥٥ °م لمدة ٢ ساعة .
٥. بردت الأنابيب إلى درجة حرارة ٣٧ °م وأضيف إليها ٢ مليليتر من محلول NaCl ، ثم أضيف ٥ مليليتر من الكلوروفورم مع التقليب المستمر للأنابيب لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة .
٦. نبذت الأنابيب بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة .
٧. نقلت الطبقة المائية العليا إلى أنبوب معقم وأضيف الايزوبروبانول المبرد بما يعادل ثلثي الحجم الأصلي ، رج ببطء لمدة ٣ دقائق ، حفظ الأنبوب عند درجة حرارة - ٢٠ °م لمدة ٣٠ دقيقة .
٨. نبذت الأنابيب مركزياً بسرعة ١٠٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة ٤ °م ، أهمل الراشح وترك الراسب ليجف .
٩. أذيب الراسب بـ ١٠٠ – ٢٠٠ مايكروليتر من دارئ TE وحفظ عند درجة حرارة - ٢٠ °م لحين إجراء الترحيل .

## ٣ – ٢ – ٩ الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

**( Maniatis *et al.*, ١٩٨٢ )**

تم الكشف عن النمط البلازميدي للعزلات قيد الدراسة بعملية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز .

١. حضر الهلام من إذابة ٠.٤ غم من الاكاروز مع ٥٠ مليليتر من دارئ الـ TBE وسُخِّن حتى الغليان ، ترك ليبرد إلى درجة حرارة ٤٥ – ٥٠ °م .
٢. أضيف له ٢ مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم .
٣. تم تهيئة قالب الصب ( Tray ) بإحاطة حافتاه بشريط لاصق وثبت المشط ( Comb ) الخاص بعمل الحفر ( Wells ) بالقرب من إحدى نهايتيه ، صب الهلام مع مراعاة وضع القالب على سطح مستوٍ وترك بعدها ليتصلب .
٤. رفع المشط بهدوء من الهلام المتصلب ، أزيل الشريط اللاصق من جانبي قالب الصب وثبت القالب على مسانده في حوض الترحيل الكهربائي ( Tank ) الذي سبق ملؤه بدارئ TBE إذ غمر هذا المحلول سطح الهلام كلياً .
٥. حمّل الهلام بنماذج الدنا بمقدار ٢٥ مايكروليتر لكل عينة مضاف إليه ٥ مايكروليتر من دارئ التحميل ( Loading Buffer ) ، بعدها مرر تيار كهربائي بفرق جهد مقداره ٦٥ فولت مدة ٢ – ٣ ساعة .
٦. فحصت مواقع حزم الدنا المستخلص والمُرحّل في هلام الأكاروز باستخدام باعث الأشعة فوق البنفسجية ( U.V. Transilluminator ) عند طول موجي مقداره ٣٥٠ نانوميتر ، وتم تصويره .

## ٣ – ٢ – ١٠ التحول البكتيري Bacterial Transformation

**( Maniatis *et al.*, ١٩٨٢ )**

استخدم الدنا البلازميدي المستخلص من بعض العزلات المراد اختبارها لتحويل سلالة البكتريا *E. coli* MM٢٩٤ ( $Rif^r$ ) ، وكما يأتي :

١. لقح ٥٠ ملليتراً من وسط SOC السائل في دورق سعة ٢٥٠ ملليتراً بـ ١ ملليتر من مزرعة السلالة *E. coli* MM٢٩٤ بعمر ١٨ ساعة ، حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة ١٠٠ دورة / دقيقة عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٣ ساعات .
٢. وزع النمو البكتيري في أنابيب اختبار بمقدار ١٠ ملليتر ووضعت في الثلج لمدة ١٠ دقائق ، نبذت مركزياً بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة مدة ١٥ دقيقة .
٣. أهمل الراشح ثم قلبت الأنابيب الحاوية على راسب الخلايا على ورقة ترشيح معقمة لمدة دقيقة واحدة مع المحافظة على برودة الأنابيب .
٤. علقت الخلايا بـ ٣ ملليتر من محلول كلوريد الكالسيوم المبرد .
٥. وضعت الأنابيب في الثلج لمدة ٣٠ دقيقة ثم نبذت مركزياً بالظروف السابقة نفسها.
٦. أُهمل الراشح وعلقت الخلايا بـ ١ ملليتر من محلول كلوريد الكالسيوم وبذلك تم الحصول على الخلايا المؤهلة ، وزعت هذه الخلايا بمقدار ٢٠٠ مايكروليتر في أنابيب أبندروف معقمة .
٧. أخذت ثلاث أنابيب حاوية على الخلايا المؤهلة ، أضيف للأولى ١٠ مايكروليتر من داري TE ، وعُدّ أنموذجاً للسيطرة لحساب العدد الكلي للخلايا المؤهلة ، وأضيف للأنبوبة الثانية ١٠ مايكروليتر من الدنا المستخلص من العزلة المراد اختبارها ، وأضيف للأنبوبة الثالثة ١٠ مايكروليتر من دنا بلازميد pBR٣٢٢ المستخدم كسيطرة موجبة ، كذلك استخدمت أنبوبة رابعة حاوية على الدنا البلازميدي للعزلة المراد اختبارها فقط .
٨. وضعت الأنابيب في الثلج لمدة ٤٢ – ٦٠ دقيقة ، بعد ذلك عُرّضت الخلايا إلى صدمة حرارية بوضع الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة ٤٢ °م لمدة ٩٠ ثانية ، ثم أعيد وضعها في الثلج مدة ٣ دقائق .
٩. أضيف لكل أنبوبة ٨٠٠ مايكروليتر من وسط SOC السائل وحضنت لمدة ١ – ٢ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ °م .
١٠. نُشر ١٠٠ مايكروليتر من تخافيف مناسبة لكل معاملة على أطباق من وسط الأكار المغذي ، كما تم نشر ١٠٠ مايكروليتر على الأوساط الانتخابية ( وسط الأكار المغذي الحاوي على بنسلين – ج والامبيسلين بتركيز ١٠٠ مايكروغرام لكل ملليتر من الوسط ) . حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة وفي حالة الحصول على مستعمرات مقاومة لأحد المضادات الحيوية تختبر مقاومتها للمضادات الأخرى .
١١. حُسب عدد المستعمرات النامية على الأوساط الانتخابية ( متحولات ) ، أما المستعمرات النامية على وسط الأكار المغذي فتمثل عدد الخلايا المؤهلة ، حسب تكرار التحول حسب المعادلة الآتية :

$$\text{تكرار التحول} = \frac{\text{عدد الخلايا المتحولة}}{\text{العدد الكلي للخلايا المؤهلة}}$$

## ٣ – ٢ – ١١ تحييد البلازميدات Plasmids Curing

**( Trevors, ١٩٨٦ )**

استخدمت مادة الـ SDS لتحييد بلازميدات بعض العزلات قيد الدراسة وكما يأتي :

١. حضرت مجموعة من الأنابيب ذات السدادات المحكمة سعة ٢٥ ملليتراً كل منها يحوي على ١٠ ملليتر من وسط L – Broth .

٢. أضيف لكل أنبوبة كمية من المحلول الخزين لمادة SDS للحصول على التراكيز ( ٥ ، ١٠ ، ١٥ ، ٢٠ ، ٢٥ ، ٣٠ ، ٣٥ ، ٤٠ ) مايكروغرام / مليليتر .
٣. لقحت جميع الأنابيب بـ ١٠٠ مايكروليتر من مزروع فتي البكتريا النامية على وسط L – Broth ، كما لقحت أنابيب أخرى تحوي على وسط L – Broth فقط بوصفها نماذج سيطرة ، حضنت جميع الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة .
٤. تم نشر ١٠٠ مايكروليتر من تخافيف مناسبة لعينات أخذت من الأنابيب التي تحتوي على أعلى تركيز من المادة المحيدة والذي اظهر نمواً للبكتريا يمكن ملاحظته بالعين المجردة ، ومن أنابيب السيطرة على وسط Brain Heart Infusion Agar وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة .
٥. كررت ٣٠٠ مستعمرة منفردة من كل تركيز باستعمال طريقة الالتقاط والنقل ( Pick and Patch ) إلى أطباق بتري حاوية على وسط Brain Heart Infusion Agar لتكون بمثابة أطباق مرجعية ( Master Plates ) وإلى أطباق حاوية على أوساط انتخابية ( وسط BHIA الحاوي على بنسلين – ج والامبيسلين بتركيز ١٠٠ مايكروغرام لكل مليليتر من الوسط ) ، حضنت جميع الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة .
٦. حددت المستعمرات التي فشلت في النمو على الأوساط الانتخابية وأكدت حساسيتها للمضادات الحيوية .

# ٤ ـ النتائج والمناقشة Results and Discussion

## ٤ ـ ١ العزل والتشخيص

### ٤ ـ ١ ـ ١ جمع العينات

جُمعت ٢١٥ عينة لحب الشباب مُشخصة سريرياً ، تضمنت ٩٥ عينة فدام و١٢٠ عينة بثور من ١٦٦ مريض من كِلا الجنسين ، وبأعمار تراوحت من ١٣ ـ ٣٣ سنة ، كما موضحة في الجدول ٤ ـ ١ .

**جدول ٤ ـ ١ . أنواع العينات وتوزيعها حسب الجنس**

| جنس المريض | نوع العينة | | المجموع |
|---|---|---|---|
| | الفدام | البثور | |
| الذكور | ٤٢ | ٦٥ | ١٠٧ |
| الإناث | ٥٣ | ٥٥ | ١٠٨ |
| العدد الكلي | ٩٥ | ١٢٠ | ٢١٥ |

بينت النتائج بأن إصابات الذكور كانت ٧٨ إصابة ( ٤٦.٩ % ) ، أما إصابات الإناث فكانت ٨٨ ( ٥٣.١ % ) ، أي إن تكرار الإصابة في الإناث أكثر من الذكور ، الجدول ٤ ـ ٢ .

**جدول ٤ ـ ٢ . العلاقة بين الإصابة بحب الشباب والفئات العمرية للإناث والذكور**

| الفئات العمرية ( سنة ) | الإناث | % | الذكور | % | العدد الكلي | % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ١٣ ـ ١٨ | ٣٨ | ٤٣.١ | ٢٩ | ٣٧.١ | ٦٧ | ٤٠.٤ |
| ١٨ ـ ٢٣ | ٣٤ | ٣٨.٦ | ٣٨ | ٤٨.٧ | ٧٢ | ٤٣.٤ |
| ٢٣ ـ ٢٨ | ١٠ | ١١.٣ | ٦ | ٧.٦ | ١٦ | ٩.٦ |
| ٢٨ ـ ٣٣ | ٦ | ٦.٨ | ٥ | ٦.٤ | ١١ | ٦.٦ |
| المجموع | ٨٨ | ٥٣.١ | ٧٨ | ٤٦.٩ | ١٦٦ | ١٠٠ |

تشير النتائج المبينة في الجدول ٤ ـ ٢ إلى أن المرحلة التي تضم الفئة العمرية ١٣ ـ ١٨ سنة هي الأكثر إصابة في الإناث ، ويعزى السبب في ذلك إلى الوقت المبكر لمرحلة النضج الجنسي وبدأ المراهقة عند الإناث مقارنةً بالذكور ( Yeung *et al*., ٢٠٠٢ ) . وهذا ما أكدته أيضاً نتائج دراسات محلية ( Douri, ١٩٩٧; Faraj, ١٩٨٩ ) ، وأخرى سعودية ( Al-Ameer and Al-Akloby, ٢٠٠٢ ) ، إذ بين الباحثان أن ظهور حب الشباب في الإناث يبدأ بفارق سنة ونصف السنة تقريباً عمّا هو عليه في الذكور .

إن ظهور حب الشباب يُعد بداية لمرحلة النضوج والمراهقة لكلا الجنسين ( Burton *et al* ,١٩٧١; Stathakis *et al*., ١٩٩٧; Kilkenny *et al*., ١٩٩٨ ) .

تُشير النتائج المبينة في الجدول ٤ ـ ٢ أن قمة حدوث المرض تكون بين الفئة العمرية ١٨ ـ ٢٣ سنة ، إذ بلغت أعلى نسبة ٤٣.٤ % لكلا الجنسين ، تليها الفئة العمرية ١٣ ـ ١٨ والتي بلغت ٤٠.٤ % ثم الفئة ٢٣ ـ ٢٨ وكانت النسبة ٩.٦ % وأخيراً الفئة العمرية ٢٨ ـ ٣٣ بنسبة ٦.٦ % ، وهذا ما أكدته نتائج دراسة محلية ( العنبكي ، ٢٠٠١ ) ، لكن هذه

النتائج لا تتفق مع ما أشارت إليه دراسات أخرى ، من أن قمة حدوث المرض وشدته يقع ضمن المدى العمري ١٤ – ١٧ للإناث و ١٦ – ١٩ بالنسبة للذكور ( Rossen and Roed – Petersen, ١٩٩٣; Sharpe, ١٩٩٥ ) . وهذا الاختلاف ربما يعزى إلى تداخل عدّة عوامل تختلف باختلاف الموقع الجغرافي وطبيعة المناخ ، فضلاً عن العامل الوراثي وعامل التغذية وغيرها من العوامل المؤثرة بصورة مباشرة أو غير مباشرة في ظهور حب الشباب أو تفاقمه .

تشير النتائج المبينة في الجدول ٤ – ٣ أن نسب شدّة الإصابة من النوع الخفيف كانت ٢٠.٤ % و ٢٥.٦ % في الإناث والذكور على التوالي ، أما النوع المتوسط فقد شكّل ٦٩.٣ % و ٥٨.٩ % في الإناث والذكور على التوالي ، في حين كان النوع الشديد أو الحاد بنسبة ١٠.٢ % في الإناث و ١٥.٣ % في الذكور ، وهذا يشير إلى أن إصابات حب الشباب من النوع الخفيف والشديد كانت في الذكور أكثر من الإناث ، ويعزى السبب إلى دور هرمون الاندروجين الذكري كمحفز فعّال لزيادة نشاط الغدد الدهنية مما ينتج زيادة في إفراز مادة الزهم المهمة في إحداث وتطور الإصابة ( Lucky *et al.*,١٩٩١; Lucky *et al.*, ١٩٩٤; Goulden *et al.*, ١٩٩٧; Stathakis *et al.*, ١٩٩٧ ) .

**جدول ٤ – ٣ . شدة الإصابة بحب الشباب لدى الجنسين**

| الجنس | خفيف | % | متوسط | % | شديد | % | العدد الكلي | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| إناث | ١٨ | ٢٠.٤ | ٦١ | ٦٩.٣ | ٩ | ١٠.٢ | ٨٨ | ٥٣.١ |
| ذكور | ٢٠ | ٢٥.٦ | ٤٦ | ٥٨.٩ | ١٢ | ١٥.٣ | ٧٨ | ٤٦.٩ |
| المجموع | ٣٨ | ٢٢.٨ | ١٠٧ | ٦٤.٤ | ٢١ | ١٢.٦ | ١٦٦ | ١٠٠ |

## ٤ – ١ – ٢ تشخيص البكتريا

توضح النتائج المبينة في الجدول ٤ – ٤ أنواع ونسب العزلات التي تم عزلها وهي ٦٤ عزلة لبكتريا *P. acnes* و١١٠ عزلة لبكتريا *S. epidermidis* و ٢٦ عزلة لبكتريا *S. aureus* وذلك بعد تنقيتها وإجراء الفحوصات الكيموحيوية كما مبين في الجدولين ٤ – ٥ و ٤ – ٦ .

**جدول ٤ – ٤ . أنواع العزلات في عينات الفدام والبثور**

| نوع العينة | *S. epidermidis* | % | *P. acnes* | % | *S. aureus* | % | G.N.R | % | العدد الكلي | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| الفدام ( ٩٥ ) | ٣٠ | ٤٠.٥ | ٣٦ | ٤٨.٦ | ٨ | ١٠.٨ | - | - | ٧٤ | ٣٦.١ |
| البثور ( ١٢٠ ) | ٨٠ | ٦١ | ٢٨ | ٢١.٣ | ١٨ | ١٣.٧ | ٥ | ٣.٨ | ١٣١ | ٦٣.٩ |
| المجموع | ١١٠ | ٥٣.٦ | ٦٤ | ٣١.٢ | ٢٦ | ١٢.٦ | ٥ | ٢.٤ | ٢٠٥ | ١٠٠ |

**الرموز : G.N.R : عصيات سالبة لصبغة كرام ( Gram Negative Rods ) .**

إذ إنَّ النوع البكتيري السائد في ٩٥ عينة فدام هو *P. acnes* وبنسبة ٤٨.٦ % ، يليه النوع البكتيري *S. epidermidis* بنسبة ٤٠.٥ % ثم *S. aureus* بنسبة ١٠.٨ % ، ويعزى سبب سيادة *P. acnes* في الفدام لقلة الضغط الاوكسجيني مما يوفر ظروف ملائمة لبقاء وتكاثر واستعمار النوع اللاهوائي المذكور ، وهذا ما جاء في دراسات سابقة ( Leeming *et al.*, ١٩٨٥; Leeming *et al.*, ١٩٨٨; Burkhart, ٢٠٠٣ ) . أما النوع البكتيري السائد في ١٢٠ عينة بثور كان *S. epidermidis* بنسبة ٦١ % يليه النوع البكتيري *P. acnes* بنسبة ٢١.٣ % ثم بنسبة *S. aureus* بنسبة ١٣.٧ % وقد عزلت بعض الأنواع من البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام وبنسبة ٣.٨ % .

**جـــدول ٤ – ٥ . الاختبـــارات الكيموحيويـــة لعـــزلات *S. epidermidis* و *S. aureus***

| ت | الاختبارات الكيموحيوية | *S. epidermidis* | *S. aureus* |
|---|---|---|---|
| ١ | اختبار الكاتاليز Catalase | + | + |
| ٢ | اختبار الاوكسيديز Oxidase | - | - |
| ٣ | اختبارالكواكيوليز Coagulas | - | + |
| ٤ | اختبار الهيمولايسين | β ± | β |
| ٥ | النمو على أكار المانتول الملحي | - | + |
| ٦ | اختبار اختزال النترات | + | + |
| ٧ | اختبار إنتاج إنزيم اليوريز | - | + |
| ٨ | اختبار إنتاج إنزيم اللاييبز | + | + |
| ٩ | اختبار تمييع الجيلاتين | - | + |
| ١٠ | اختبار Triple Sugar Iron | - | - |
| ١١ | اختبار الاندول | - | - |
| ١٢ | اختبار أحمر المثيل | - | + |
| ١٣ | اختبار تكوين الأستيون فوكس بروسكار | - | + |
| ١٤ | اختبار استهلاك السترات | - | - |
| ١٥ | تخمر سكر الكلوكوز | + | + |
| ١٦ | تخمر سكر المانيتول | - | + |
| ١٧ | تخمر سكر المالتوز | + | + |
| ١٨ | تخمر سكر السكروز | + | + |
| ١٩ | تخمر سكر التريهالوز | - | + |
| ٢٠ | تخمر سكر اللاكتوز | + | + |
| ٢١ | تخمر سكر المانوز | - | + |

الرمـــوز : + نتيجـــة موجبـــة ، - نتيجـــة ســـالبة ، ± متغيـــرة ، β تحلـــل الـــدم مـــن النـــوع الكامل .

**جدول ٤ – ٦ . الاختبارات الكيموحيوية لعزلات *P. acnes***

| ت | الاختبارات الكيموحيوية | *P. acnes* |
|---|---|---|
| ١ | اختبار الكاتاليز Catalase | + |

| | | |
|---|---|---|
| ٢ | اختبار الاوكسيديز Oxidase | - |
| ٣ | اختبار تمييع الجيلاتين | + |
| ٤ | اختبار الهيمولايسين | β |
| ٥ | اختبار إنتاج إنزيم اللايبيز | + |
| ٦ | تخمر سكر الكلوكوز | + |
| ٧ | تخمر سكر المالتوز | - |
| ٨ | تخمر سكر السكروز | - |

الرموز : + نتيجة موجبة ، - نتيجة سالبة ، β تحلل الدم من النوع الكامل .

لقد أشارت دراسات سابقة ( Marples and Izumi,١٩٧٠; Webster *et al.*, ١٩٨٥; Burkhart, ٢٠٠٣ ) إلى إن زيادة نسب بكتريا *S. epidermidis* في البثور يعود إلى الظروف الملائمة لبقائها مثل الضغط الاوكسيجيني العالي وعدم تفضيلها من قبل خلايا كريات الدم البيضاء العِلة ( Neutrophils ) ، إذ تفضل هذه الخلايا بكتريا *P. acnes* أكثر بسبب قابلية الأخيرة على إفراز أكثر من مادة جذب كيمياوية ( Chemotactic Factors ) وبهذا يتحفز الجهاز المناعي ضد البكتريا اللاهوائية *P. acnes* المتواجدة في منطقة الإصابة مؤدياً إلى تقليل أعدادها في البثور .

## ٤ – ٢ مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية ١٣ عزلة من بكتريا *P. acnes* و١١٠ عزلة من بكتريا *S. epidermidis* و ٢٦ عزلة من بكتريا *S. aureus* تجاه ١٩ مضاد حيوي شائع الاستعمال ، وحُددت مقاومتها للمضادات الحيوية اعتماداً على قياس قطر منطقة التثبيط ( بالمليمتر ) وفقاً لما ورد في National Committee For Clinical Laboratory Standards ( NCCLS, ١٩٩٠ ) ، ملحق ١ .

أوضحت النتائج المبينة في الجداول ٤ – ٧ و ٤ – ٨ و ٤ – ٩ أن اغلب العزلات أظهرت صفة تعدد المقاومة وكانت ذات مستوى عالي من المقاومة لمعظم مضادات البيتالاكتام المتضمنة بنسلين ج ، الاموكسيلين ، الامبيسلين ، والامبيكلوكس ، فقد كانت جميع عزلات *S. epidermidis* و *S. aureus* مقاومة ( ١٠٠ % ) لمضاد بنسلين ج ، في حين أبدت عزلات *P. acnes* مقاومة أوطأ لهذا المضاد ( ٧٦.٩٢ % ) . أما الاموكسيلين والامبيسلين والامبيكلوكس فقد أظهرت العزلات للأنواع البكتيرية المذكورة مقاومة مختلفة تجاه هذه المضادات .

وبشكل عام يمكن الاستنتاج أن نسب المقاومة لمضادات البيتالاكتام بين جميع العزلات كانت عالية ، وقد يعود ذلك إلى قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز الذي يعمل على تحطيم حلقة β – Lactam لجزيئة البنسلين ومشتقاته ومن ثم تثبيط فعل المضاد الحيوي ، وهذا ما أكدته الكثير من الدراسات لامتلاك الكثير من الأنواع البكتيرية ومنها *P. acnes* و *S. epidermidis* و *S. aureus* القابلية على إنتاج إنزيمات البيتالاكتميز ( Leyden *et al.*, ١٩٨٣; Rosdahl *et al.*, ١٩٨٦; Kernodle *et al.*, ١٩٩٠; Bonfiglio and Livermore, ١٩٩٤; Coates *et al.*, ٢٠٠٢ ) .

**جدول ٤ – ٧ . الحساسية الدوائية لعزلات *P. acnes***

| المجموعة | المضاد الحيوي | الاستجابة | عدد العزلات | % |
|---|---|---|---|---|
| البنسلينات | Penicillin G | R | ١٠ | ٧٦.٩٢ |
| | | S | ٣ | ٢٣.٠٧ |
| | Ampicillin | R | ٨ | ٦١.٥٣ |
| | | S | ٥ | ٣٨.٤٦ |
| | Ampiclox | R | ٧ | ٥٣.٨٤ |
| | | S | ٦ | ٤٦.١٥ |
| | Amoxycillin | R | ٩ | ٦٩.٢٣ |
| | | S | ٤ | ٣٠.٧٦ |
| السيفالوسبورينات | Cephalexin | R | ٤ | ٣٠.٧٦ |
| | | S | ٩ | ٦٩.٢٣ |
| | Cefotaxime | R | ٣ | ٢٣.٠٧ |
| | | S | ١٠ | ٧٦.٩٢ |
| الأمينوكلايكوسيدات | Amikacin | R | ٣ | ٢٣.٠٧ |
| | | S | ١٠ | ٧٦.٩٢ |
| | Neomycin | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |
| | Gentamycin | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |
| الكينولونات | Ciprofloxacin | R | ٣ | ٢٣.٠٧ |
| | | S | ١٠ | ٧٦.٩٢ |
| الكلورامفنيكولات | Chloramphenicol | R | ٣ | ٢٣.٠٧ |
| | | S | ١٠ | ٧٦.٩٢ |
| الريفامبسينات | Rifampicin | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |
| التتراسايكلينات | Tetracycline | R | ٦ | ٤٦.١٥ |
| | | S | ٧ | ٥٣.٨٤ |
| | Doxycycline | R | ١ | ٧.٦٩ |
| | | S | ١٢ | ٩٢.٣٠ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| السلفانومايت | Trimethoprim / Sulfamethoxazol | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |
| الماكروليدات | Erythromycin | R | ٦ | ٤٦.١٥ |
| | | S | ٧ | ٥٣.٨٤ |
| | Clindamycin | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |
| | Lincomycin | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |
| الكاربابنيمات | Imipenem | R | ٢ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ١١ | ٨٤.٦١ |

**الرموز : R : مقاومة ( Resistance ) ، S : حساسة ( Sensitive ) .**

**جدول ٤ – ٨ . الحساسية الدوائية لعزلات *S. epidermidis***

| المجموعة | المضاد الحيوي | الاستجابة | عدد العزلات | % |
|---|---|---|---|---|
| البنسلينات | Penicillin G | R | ١١٠ | ١٠٠ |
| | | S | ٠ | ٠ |
| | Ampicillin | R | ٦٠ | ٥٤.٥٤ |
| | | S | ٥٠ | ٤٥.٤٥ |
| | Ampiclox | R | ٧٥ | ٦٨.١٨ |
| | | S | ٣٥ | ٣١.٨١ |
| | Amoxycillin | R | ٨٠ | ٧٢.٧٢ |
| | | S | ٣٠ | ٢٧.٢٧ |
| السيفالوسبورينات | Cephalexin | R | ٢٦ | ٢٣.٦٣ |
| | | S | ٨٤ | ٧٦.٣٦ |
| | Cefotaxime | R | ٣٢ | ٢٩.٠٩ |
| | | S | ٧٨ | ٧٠.٩٠ |
| الأمينوكلايكوسيدات | Amikacin | R | ١٦ | ١٤.٥٤ |
| | | S | ٩٤ | ٨٥.٤٥ |
| | Neomycin | R | ٢٣ | ٢٠.٩٠ |
| | | S | ٨٧ | ٧٩.٠٩ |
| | Gentamycin | R | ٢٤ | ٢١.٨١ |
| | | S | ٨٦ | ٧٨.١٨ |
| الكينولونات | Ciprofloxacin | R | ٣٢ | ٢٩.٠٩ |
| | | S | ٧٨ | ٧٠.٩٠ |
| الكلورامفنيكولات | Chloramphenicol | R | ٢٠ | ١٨.١٨ |
| | | S | ٩٠ | ٨١.٨١ |
| الريفامبسينات | Rifampicin | R | ١٦ | ١٤.٥٤ |
| | | S | ٩٤ | ٨٥.٤٥ |
| التتراسايكلينات | Tetracycline | R | ٤٧ | ٤٢.٧٢ |
| | | S | ٦٣ | ٥٧.٢٧ |
| | Doxycycline | R | ٣ | ٢.٧٢ |
| | | S | ١٠٧ | ٩٧.٢٧ |
| السلفانومايت | Trimethoprim / Sulfamethoxazol | R | ٣٠ | ٢٧.٢٧ |
| | | S | ٨٠ | ٧٢.٧٢ |
| الماكروليدات | Erythromycin | R | ٤٨ | ٤٣.٦٣ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | S | ٦٢ | ٥٦.٣٦ |
| | Clindamycin | R | ٧ | ٦.٣٦ |
| | | S | ١٠٣ | ٩٣.٦٣ |
| | Lincomycin | R | ٢٦ | ٢٣.٦٣ |
| | | S | ٨٤ | ٧٦.٣٦ |
| الكارابنيمات | Imipenem | R | ١١ | ١٠ |
| | | S | ٩٩ | ٩٠ |

**الرموز : R : مقاومة ( Resistance ) ، S : حساسة ( Sensitive ) .**

**جدول ٤ – ٩ . الحساسية الدوائية لعزلات *S. aureus***

| المجموعة | المضاد الحيوي | الاستجابة | عدد العزلات | % |
|---|---|---|---|---|
| البنسلينات | Penicillin G | R | ٢٦ | ١٠٠ |
| | | S | ٠ | ٠ |
| | Ampicillin | R | ١٨ | ٦٩.٢٣ |
| | | S | ٨ | ٣٠.٧٦ |
| | Ampiclox | R | ١٧ | ٦٥.٣٨ |
| | | S | ٩ | ٣٤.٦١ |
| | Amoxycillin | R | ٢٠ | ٧٦.٩٢ |
| | | S | ٦ | ٢٣.٠٧ |
| السيفالوسبورينات | Cephalexin | R | ٤ | ١٥.٣٨ |
| | | S | ٢٢ | ٨٤.٦١ |
| | Cefotaxime | R | ٨ | ٣٠.٦٧ |
| | | S | ١٨ | ٦٩.٢٣ |
| الأمينوكلايكوسيدات | Amikacin | R | ١١ | ٤٢.٣٠ |
| | | S | ١٥ | ٥٧.٦٩ |
| | Neomycin | R | ٥ | ١٩.٢٣ |
| | | S | ٢١ | ٨٠.٧٦ |
| | Gentamycin | R | ١١ | ٤٢.٣٠ |
| | | S | ١٥ | ٥٧.٦٩ |
| الكينولونات | Ciprofloxacin | R | ٧ | ٢٦.٩٢ |
| | | S | ١٩ | ٧٣.٠٧ |
| الكلورامفنيكولات | Chloramphenicol | R | ١١ | ٤٢.٣٠ |
| | | S | ١٥ | ٥٧.٦٩ |
| الريفامبسينات | Rifampicin | R | ٢ | ٧.٦٩ |
| | | S | ٢٤ | ٩٢.٣٠ |
| التتراسايكلينات | Tetracycline | R | ١٢ | ٤٦.١٥ |
| | | S | ١٤ | ٥٣.٨٤ |
| | Doxycycline | R | ١ | ٣.٨٤ |
| | | S | ٢٥ | ٩٦.١٥ |
| السلفانومايت | Trimethoprim / Sulfamethoxazol | R | ١١ | ٤٢.٣٠ |
| | | S | ١٥ | ٥٧.٦٩ |
| الماكروليدات | Erythromycin | R | ١٢ | ٤٦.١٥ |
| | | S | ١٤ | ٥٣.٨٤ |
| | Clindamycin | R | ٢ | ٧.٦٩ |
| | | S | ٢٤ | ٩٢.٣٠ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Lincomycin | R | ١١ | ٤٢.٣٠ |
| | | S | ١٥ | ٥٧.٦٩ |
| الكاربابنيمات | Imipenem | R | ٢ | ٧.٦٩ |
| | | S | ٢٤ | ٩٢.٣٠ |

**الرموز : R : مقاومة ( Resistance ) ، S : حساسة ( Sensitive ) .**

بينت دراسة Harkaway وزملاؤه ( ١٩٩٢ ) أن المقاومة لمضادات حيوية دون أخرى قد يُعزى إلى الاستخدام المستمر والعشوائي وبدون استشارة طبية من المرضى .

من هنا فإن المقاومة للتتراسايكلين والارثرومايسين لجميع العزلات البكتيرية قد يعود سببها إلى كثرة استعمال هذين المضادين موضعياً وجهازياً ومن ثم ظهور تلك المقاومة ، إذ يرتبط الارثرومايسين مع رايبوسومات البكتريا ويتداخل مع تصنيع البروتين ، بينما يمتاز مضاد التتراسايكلين بكونه فعالاً ضد حب الشباب ، ويمتلك فعالية مضادة للبكتريا ، إذ يُثبط الفعالية التحليلية للدهون لبكتريا *P. acnes* ، كذلك يمتلك فعالية مضادة للالتهاب ، فضلاً عن قابليته على تثبيط أو إيقاف فعالية إنزيم اللايبيز ( Lipase ) لبكتريا *S. aureus* ( Kurokawa *et al.*, ١٩٨٨; Roberts, ١٩٩٦; Schnappinger and Hillen, ١٩٩٦ ) .

أشارت دراسات أجريت في الولايات المتحدة الأمريكية والمملكة المتحدة إلى أن بكتريا *P. acnes* المعزولة من إصابات حب الشباب كانت مقاومة للارثرومايسين لمرضى يتعاطون هذا المضاد ، فضلاً عن عزل سلالات متعددة مقاومة لمضادات الارثرومايسين والتتراسايكلين والكلندامايسين ( Crawford *et al.*, ١٩٧٩; Leyden, ١٩٨٣; Eady *et al.*, ١٩٨٩; Eady *et al.*, ١٩٩٣ ) .

وفي دراسة مقارنة لفعل مضاد الارثرومايسين تجاه البكتريا المسببة لحب الشباب ، أشارت النتائج التي حصل عليها Ross وجماعته ( ٢٠٠١ ) أن دول البحر الأبيض المتوسط قد سجلت أعلى نسبة مقاومة لهذا المضاد ، إذ سجلت أسبانيا نسبة مقاومة ( ٩١ % ) تلتها اليونان ( ٧٥.٣ % ) ثم ايطاليا ( ٥٩.٥ % ) ، مقارنة بهولندا والسويد والمملكة المتحدة التي سجلت جميعها النسبة ( ٤١.٥ % ) .

أما في دراسة Dreno وجماعته ( ٢٠٠١ ) فقد تم عزل *S. epidermidis* مقاومة لمضاد الارثرومايسين بنسبة ٩٥ % من مصابين يتعاطون هذا المضاد لغرض العلاج .

وفي دراسة أجريت في اليابان من Nishijima وجماعته ( ٢٠٠٠ ) تم عزل أكثر من ٣٠ % من بكتريا *S. epidermidis* مقاومة للارثرومايسين قبل تعاطي المرضى للعلاج ، وعلل الباحث وجماعته سبب ذلك إلى كثرة استعمال اليابانيين للارثرومايسين والتتراسايكلين في علاج إصابات الجلد المختلفة .

يتضح من نتائج الجداول ٤ – ٧ و ٤ – ٨ و ٤ – ٩ أن جميع العزلات قيد الدراسة أبدت حساسية عالية تجاه مضاد الدوكسي سايكلين ، ويُعد من المضادات الكفوءة في علاج حب الشباب ، وهذا ما أكده الأطباء العاملين في هذا المجال ، إذ يمتلك هذا المضاد فعالية طيف واسعة ضد الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، وهو من الجيل الثاني للتتراسايكلينات ، ويعطى في حالة المصابين بحب الشباب الذين لم يستجيبوا لعلاج الجيل الأول ، ويمتاز بكونه محباً للدهون ( Lipophilic ) إذ يتجمع في الغدد الدهنية مما يؤدي إلى قتل الأحياء المجهرية الموجودة في تلك الغدد ( Leyden *et al.*, ٢٠٠١; Webster, ٢٠٠٢ ) .

## ٤ – ٣ التحري عن إنتاج إنزيم البيتالاكتميز

استخدمت طريقة اليود القياسية لاختبار قابلية عزلات *P. acnes* و *S. epidermidis* و *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز ، وتعتمد هذه الطريقة على أساس تفاعل اليود مع النشا لتكوين معقد لوني ازرق غامقاً ، إذ تقوم البكتريا المنتجة لهذا الإنزيم بكسر حلقة البيتالاكتم وتحويل البنسلين إلى حامض البنسلوك ( Penicillioc Acid ) الذي يقوم باختزال اليود إلى يوديد ، ويكون الأخير فاقد لقابلية التفاعل مع النشا وتكوين المعقد اللوني الأزرق مما يؤدي إلى تحول اللون مباشرة إلى الأبيض ( Sykes and Mattew, ١٩٧٦ ) .

يتضح من النتائج في الجدول ٤ – ١٠ أن ١٠٠ % من عزلات *S. epidermidis* و *S. aureus* و ٧٦.٩ % من عزلات *P. acnes* المقاومة لمضادات البيتالاكتام ، أعطت نتيجة موجبة لفحص إنتاج البيتالاكتميز ، كما أعطت ٢٠ عزلة من بكتريا *S. aureus* و ١٥ عزلة لبكتريا *S. epidermidis* تغييراً سريعاً جداً ، أي بعد ثواني من إضافة الكواشف ، بينما استجابت بقية العزلات للفحص بعد أزمانٍ مختلفة .

**جدول ٤ – ١٠ . العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتميز والفترة الزمنية لحصول التغيير اللوني**

| ت | البكتريا | عدد العزلات | وقت التغير اللوني ( دقيقة ) |
|---|---|---|---|
| ١ | *S. epidermidis* | ١٥ | أقل من دقيقة |
| | | ٣١ | ٥ |
| | | ١٧ | ٦ |
| | | ١٢ | ٧ |
| | | ٢٥ | ٩ |
| | | ١٠ | ١٠ |
| ٢ | *S. aureus* | ٢٠ | أقل من دقيقة |
| | | ٢ | ٥ |
| | | ٣ | ٧ |
| | | ١ | ٩ |
| ٣ | *P. acnes* | ٣ | ٥ |
| | | ٢ | ١٠ |
| | | ٥ | ١٢ |

يمكن تفسير هذه النتائج اعتماداً على تركيز إنزيم البيتالاكتميز ، إذ إن الاختزال السريع لليود إلى يوديد يعتمد على تركيز وفعالية الإنزيم ، وان هذه الفعالية تتأثر بدرجات الحرارة

والرقم الهيدروجيني ، وكمية الإنزيم المنتج خارجياً ، عليه يمكن القول أن العزلة التي أعطت فحصاً موجباً أسرع من بقية العزلات لها من جزيئات الإنزيم ما يكفي لتحويل أكبر عدد من جزيئات البنسلين – ج إلى حامض البنسلوك وهذا يؤدي إلى ظهور النتيجة الموجبة سريعاً ( Foley and Perret, ١٩٦٢ ) .

امتازت هذه الطريقة بسهولة إجرائها ، وقصر المدة الزمنية لإعطاء النتيجة ( Bush *et al.*, ١٩٩٥ ) ، فضلاً عن توفر المواد اللازمة للاختبار . أما مساوئها فهي احتمال إعطاء نتيجة كاذبة عند استخدام مضاد محضر منذ مدة زمنية ، لذا يفضل تحضيره آنياً ( Sykes and Mattew, ١٩٧٦ ) .

يُعد هذا الاختبار جيداً للبكتريا الموجبة لصبغة كرام وذلك لتحرير إنزيماتها خارج الخلية مقارنة مع البكتريا السالبة للصبغة ( Perret, ١٩٥٤ ) .

## ٤ – ٤ إنتاج المادة المخاطية

أُختيرت ٧ عزلات لكل من *S. epidermidis* و *S. aureus* التي تميزت بكونها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية ومنتجة لإنزيم البيتالاكتميز ، لاختبار مدى قابليتها على إنتاج المادة المخاطية التي تُعد أحد عوامل الضراوة ( Cramtone *et al.*, ١٩٩٩ ) .

وقد تمكنت ٥ عزلات من بكتريا *S. epidermidis* و ٤ عزلات من بكتريا *S. aureus* من إنتاج المادة المخاطية على وسط TSB ، إذ يُعد هذا الوسط المفضل لإنتاج المادة المخاطية ، وذلك لاحتوائه على مواد محفزة ومنشطة لإنتاج المادة المخاطية ، كسكر الدكستروز والتربتون والفايتون ، إذ تدخل هذه المكونات كمصادر كربونية مهمة في تخليق السكريات المتعددة التي تتكون منها المادة المخاطية ( Christensin *et al.*, ١٩٨٢b; Christensin *et al.*, ١٩٨٥ ) .

وقد استخدمت صبغة السفرانين في هذا الفحص، إذ تصطبغ الجدران الداخلية للأنبوبة لالتصاق الصبغة بالمادة المخاطية المفرزة نتيجة للزوجتها ( Hogt *et al.*, ١٩٨٣ ) .

أوضحت عدّة دراسات أن المادة المخاطية قد تكون أحد أسباب مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية ، إذ تعمل هذه المادة كحاجز يمنع نفوذ المضاد الحيوي إلى داخل الخلية مما يضفي عليها صفة المقاومة ومن ثم فشل المضادات الحيوية في علاج الإصابات التي تنجم عن البكتريا المنتجة للمادة المخاطية ( Evans and Holmes, ١٩٨٧; Christensin *et al.*, ١٩٨٧; Tunney *et al.*, ١٩٩٨ ) .

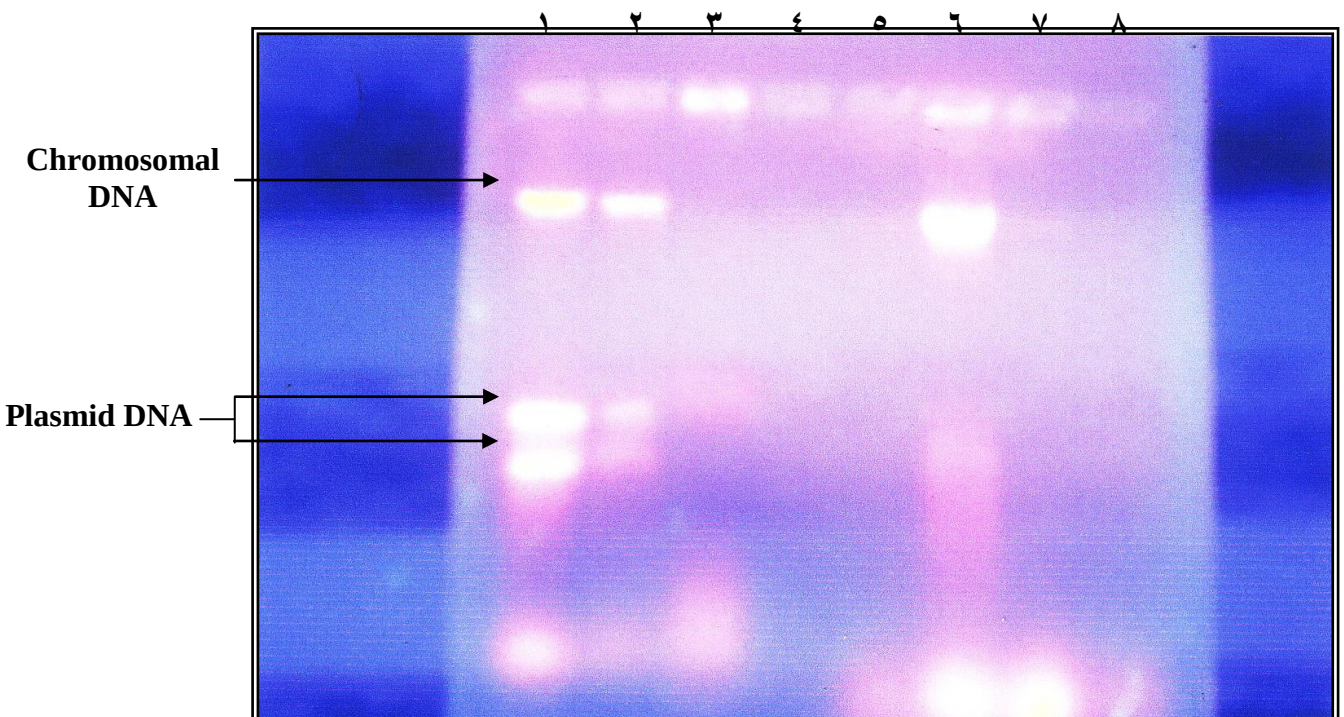
## ٤ – ٥ المحتوى البلازميدي

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لعدد من عزلات الأنواع البكتيرية *P. acnes* و *S. epidermidis* و *S. aureus* كمحاولة للتعرف على دور هذه البلازميدات ومدى علاقتها بمقاومة المضادات الحيوية ، وانتقالها إلى العزلات المتواجدة بنفس موقع الإصابة .

تم عزل الدنا الكلي للعزلات باستخدام طريقة التمليح الخارجي ( Salting Out ) ، إذ كانت مناسبة لاستخلاص الدنا الكلي للمكورات العنقودية وذلك لأنها لا تحتاج إلى Lysostaphin في تحليل جدران الخلايا ، بل استخدام الـ Lysozyme بتركيز ٥٠ ملغم / مليليتر والذي كان كافياً لاستخلاص الدنا بصورة جيدة مع دارئ التحلل .

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز احتواء عزلات *P. acnes* على بلازميد واحد صغير ، إذ يتضح من الشكل ٤ – ١ احتواء العزلة في المسار ٢ على بلازميد

صغير ( ذو حجم مقارب لحجم pBR٣٢٢ ) ، أما العزلة في المسار ٣ فاحتوت على بلازميد ( أكبر حجماً pBR٣٢٢ ) ، بينما العزلة في المسار ٦ احتوت على بلازميد ( أصغر حجماً pBR٣٢٢ ) ، وقد أشار كل من Rehberger و Glotz ( ١٩٩٠ ) إلى احتواء عزلات بكتريا *Propionibacterium* على بلازميدات مختلفة الأحجام تتراوح أوزانها الجزئية بين أقل من ٦.٦ كيلو زوج قاعدي إلى أكثر من ١٧٨.٥ كيلو زوج قاعدي .



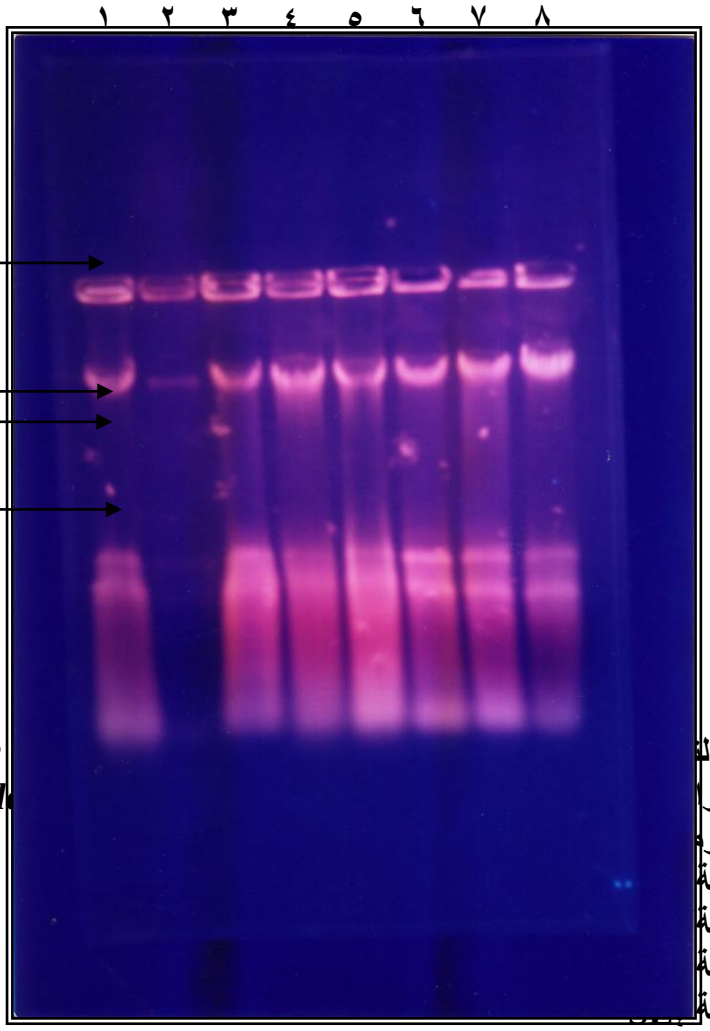
RNA ⟶

**شكل ٤ – ١ . الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *P. acnes***

**المسار ١ : البلازميد pBR٣٢٢**
**المسار ٢ : العزلة $PA_1$**
**المسار ٣ : العزلة $PA_2$**
**المسار ٤ : العزلة $PA_3$**
**المسار ٥ : العزلة $PA_4$**
**المسار ٦ : العزلة $PA_5$**
**المسار ٧ : العزلة $PA_6$**
**المسار ٦ : العزلة $PA_7$**

يظهر من الشكل ٤ – ٢ احتواء جميع عزلات بكتريا *S. epidermidis* على بلازميد واحد صغير ( ذو حجم أقل أو مقارب من pBR٣٢٢ ) ، وقد ظهر هذا البلازميد بشكلين فيزياويين ، الدائري المغلق تساهمياً ( CCC ) والخطي ( L ) .

أشارت دراسات متعددة احتواء عزلات *S. epidermidis* على بلازميدات صغيرة تحمل جينات المقاومة لعدد من المضادات الحيوية ، مثل مضادات ( Macrolides, Lincosmide, Streptogramines (MLS)) والتي تشمل مضاد الارثرومايسين ( Parisi *et al.*, ١٩٨١; Leelaporn *et al.*, ١٩٩٥ ) .



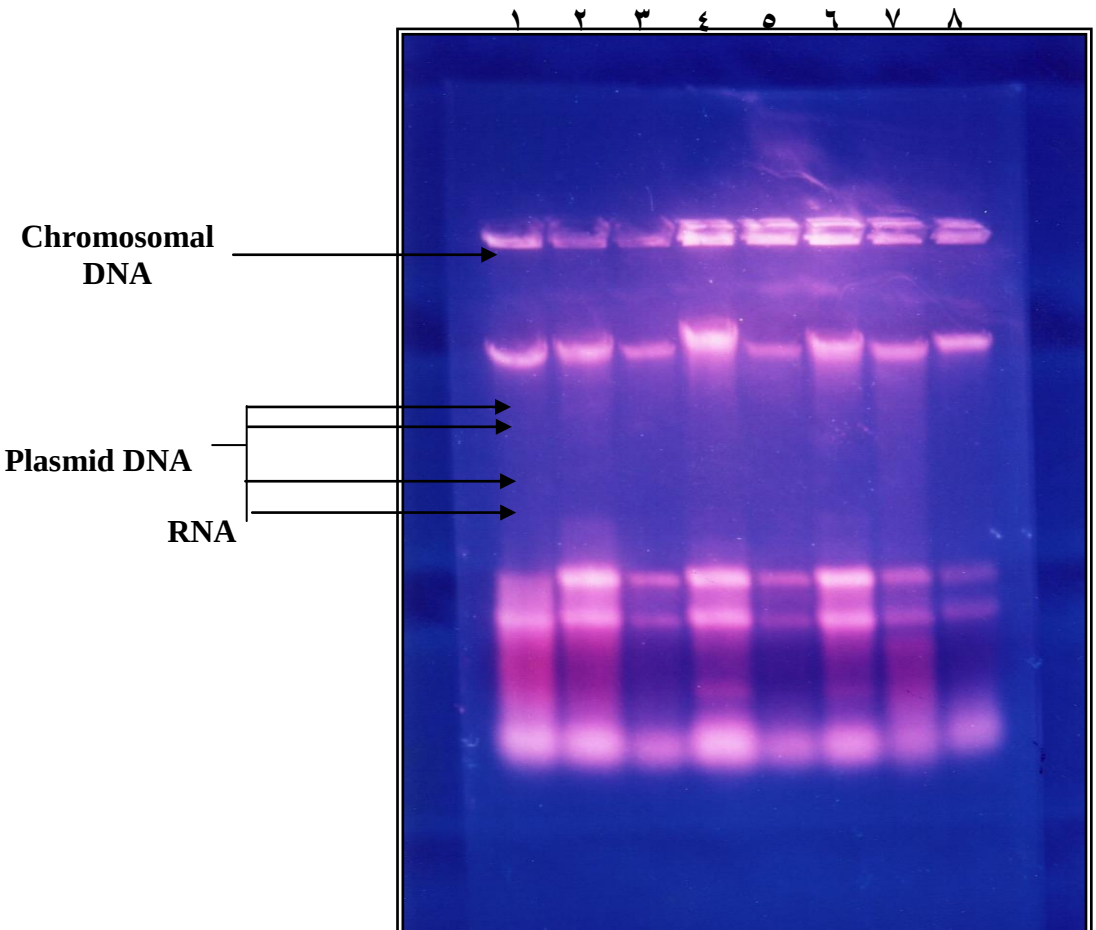
**شكل ٤ – ٢ . ال... ٦٥ فولت والذي**
**يظهر موا... *S. epid...***
**المسار ١ : البلاز...**
**المسار ٢ : العزلة...**
**المسار ٣ : العزلة...**
**المسار ٤ : العزلة...**
**المسار ٥ : العزلة...**
**المسار ٦ : العزلة $SE_{٥}$**
**المسار ٧ : العزلة $SE_{٦}$**
**المسار ٨ : العزلة $SE_{٧}$**

أما الشكل ٤ – ٣ فيوضح احتواء جميع عزلات *S. aureus* على بلازميد واحد صغير ( مقارب في الحجم إلى البلازميد pBR٣٢٢ ) وقد ظهر هذا البلازميد في المسارات ٢ ، ٣ ، ٥ ، ٨ بشكلين فيزياويين ، الدائري المغلق تساهمياً ( CCC ) والخطي( L ) ، أما المسارات ٤ ، ٦ ، ٧ فقد ظهرت بثلاثة أشكال فيزياوية ، الدائري المغلق تساهمياً ( CCC ) والخطي ( L ) والمفتوح ( OC ) . إن تعرض البلازميدات إلى ضغوط وعوامل مختلفة أثناء تحضيرها

واستخلاصها يؤدي إلى ظهور البلازميدات بأشكال مختلفة أثناء الترحيل الكهربائي ( Meyers *et al.*, ١٩٧٦ ) .

ومن الجدير بالذكر أن البلازميدات الصغيرة الحجم شائعة الوجود في جنس المكورات العنقودية وخاصة في *S. aureus* ، إذ تحتوي هذه البكتريا على بلازميدات صغيرة الحجم تحمل جينات المقاومة لبعض المضادات الحيوية وكذلك جينات المقاومة لبعض المعادن الثقيلة ( Tennent *et al.*, ١٩٨٥ ) ، وهذا ما أكدته عدة دراسات من أن بكتريا *S. aureus* تحتوي على بلازميدات صغيرة الحجم ذات وزن جزيئي بحدود ٤.٤ كيلو زوج قاعدي تحمل جينات المقاومة للتتراسايكلين ( Shaffrman *et al.*, ١٩٧٨; Groves, ١٩٧٩; Novick *et al.*,١٩٨٠ ) .

وفي دراسة أخرى ( O'Reilly *et al.*, ١٩٨١ ) أجريت على عدد من سلالات بكتريا *S. aureus* الحالّة للجلد ( Epidermalytic ) ، لوحظ احتوائها على بلازميدات ذات أحجام مختلفة تراوحت بين ٤٢ كيلو زوج قاعدي إلى أقل من ٤.٢ كيلو زوج قاعدي .



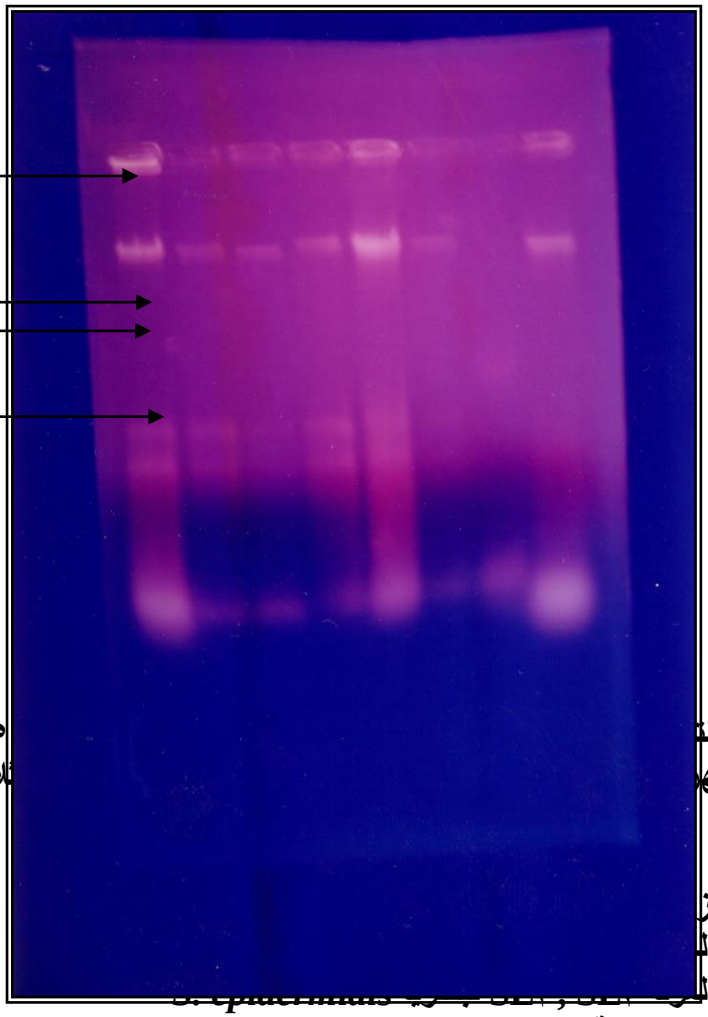
**شكل ٤ – ٣ . الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز ( ٠.٨ % ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *S. aureus***

**المسار ١ : البلازميد pBR٣٢٢**
**المسار ٢ : العزلة $SA_1$**
**المسار ٣ : العزلة $SA_2$**
**المسار ٤ : العزلة $SA_3$**
**المسار ٥ : العزلة $SA_4$**
**المسار ٦ : العزلة $SA_5$**
**المسار ٧ : العزلة $SA_6$**
**المسار ٨ : العزلة $SA_7$**

يتضح من هذه النتائج وجود تشابه في النسق البلازميدي لعزلات البكتريا الثلاثة *P. acnes* و *S. epidermidis* و *S. aureus* ، وهذا ما أُكد في الشكل ٤ – ٤ .

وقد يفسر ذلك إلى إمكانية انتقال البلازميد نفسه بين البكتريا المتواجدة معا في نفس موقع الإصابة ، والذي يعكس مدى التشابه في نمط المقاومة للمضادات الحيوية في تلك الأجناس ، وهذا الاحتمال يتفق مع نتائج دراسات أخرى أشارت إلى إمكانية انتقال صفات المقاومة للمضادات الحيوية من بكتريا *S. epidermidis* إلى بكتريا *S. aureus* نتيجة لعمليات الاقتران والتحول التي تتوسطها البلازميدات (Jaffe *et al*., ١٩٨٠; Naidoo and Noble, ١٩٨٧ ) .

وأشار Lacey ( ١٩٧٥ ) كذلك إلى بكتريا *S. epidermidis* إذ تكون بمثابة مستودع لبلازميدات المقاومة التي تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة ، والتي من الممكن انتقالها إلى بكتريا أشد أمراضية وضراوة مثل انتقالها إلى بكتريا *S. aureus* ، وهنالك عدة دراسات تدعم ذلك ( Iordanescu *et al*., ١٩٧٨; Jaffe *et al*., ١٩٨٠; Jaffe *et al*., ١٩٨٢ ) . كما أشار Sjöström وجماعته ( ١٩٧٩ ) إلى تشابه النسق البلازميدي لعزلات *S. epidermidis* و *S. aureus* المقاومة للمضادات الحيوية .




**شكل ٤ – ٤ . التـ ٦٥ فولت والذي يظهـ ثلاثة**

**المسار ١ : البلاز**
**المسار ٢ ، ٣ : ال**
**المسار ٤ ، ٥ : ال**
**المسار ٦ ، ٧ ، ٨ : العزلة $PA_{٥}$ , $PA_{٢}$ , $PA_{١}$ لبكتريا *P. acnes***

## ٤ – ٦ التحول الوراثي

تـم تحويـل سـلالة *E. coli* MM٢٩٤ بمسـتخلص الـدنا البلازميـدي للعـزلتين $SE_{٢}$ *S. epidermidis* و $SA_{١}$ *S. aureus* ، واستعمل مستخلص الدنا البلازميدي pBR٣٢٢ الحامل لصفة المقاومة للتتراسايكلين والامبيسلين لتحول السلالة *E. coli* MM٢٩٤ بوصفها سيطرة موجبة للتأكد من نجاح التجربة .

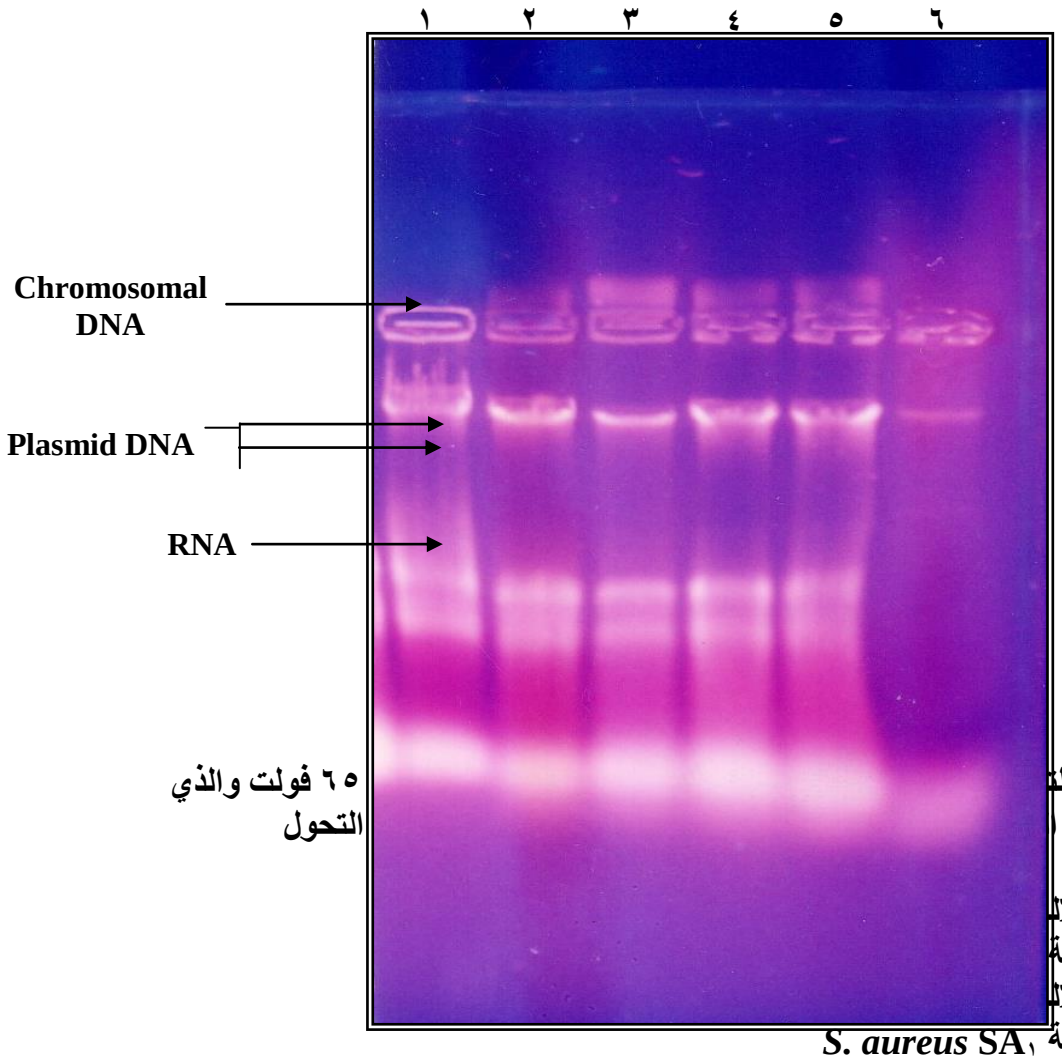
كان تردد التحول للسلالة *E. coli* MM٢٩٤ المتحولة بمستخلص الدنا البلازميدي للعزلتين ( $SE_{٢}$ ) و ( $SA_{١}$ ) هو $٣.٩ \times ١٠^{-٦}$ و $٩.٤ \times ١٠^{-٢}$ على التوالي .

تعتمد كفاءة التحول على تهيئة وتحضير الخلايا إذ إنَّ معاملة الخلايا بمادة كلوريد الكالسيوم المبرد ، ثم تعريضها لصدمة حرارية سوف يسهل من دخول الدنا البلازميدي إلى الخلايا الكفوءة ( Cohen *et al.*, ١٩٧٢ ) .

وبعد استخلاص دنا المتحولات وترحيله كهربائياً بهلام الاكاروز كان النسق البلازميدي لهذه المتحولات مشابها للنسق البلازميدي للعزلتين $SE_{٢}$ و $SA_{١}$ ، الشكل ٤ – ٥ وهذا يدل على نجاح التحول وانتقال البلازميدات الحاملة لصفة مقاومة البنسلين والامبيسلين .

إن نجـاح البلازميـدات الصـغيرة الحجـم المستخلصـة مـن العـزلتين $SE_{٢}$ و $SA_{١}$ فـي قدرتهما على التعبير المظهري في السلالة *E. coli* MM٢٩٤ يدل على ان هذه البلازميدات

ذات مدى مضيفي واسع ، إذ تشير الدراسات إلى إمكانية تعبير البلازميدات المستخلصة من بكتريا *S. aureus* في بكتريا *E. coli* ( GryCzan *et al*., ١٩٧٨; Tennent *et al*., ١٩٨٥ ) . وكذلك تستطيع أن تعبر في بكتريا *Bacillus subtilis* ( Ehrlich, ١٩٧٧; GryCzan *et al*., ١٩٧٨ ) ، بينما أشار Jaffe وجماعته ( ١٩٨٢ ) إلى إمكانية انتقال صفة المقاومة لمضاد الجنتامايسين بين *S. aureus* و *S. epidermidis* نتيجة لعمليات التحول التي تتوسطها البلازميدات .






شكل ٤ – ٥ . الت ... ٦٥ فولت والذي
يظهر ... التحول

المسار ١ : السلال...
المسار ٢ : العزلة...
المسار ٣ : السلال...
المسار ٤ : العزلة *S. aureus* SA١
المسار ٥ : السلالة *E. coli* MM٢٩٤T
المسار ٦ : السلالة *E. coli* MM٢٩٤

## ٤ – ٧ تحييد البلازميدات

الغرض الأساسي من إجراء تجارب التحييد هو لتحديد بعض الصفات التي تكون محمولة على البلازميد ومن المحتمل فقدانها أثناء معاملة الخلايا بالمواد المحيدة ( Trevors, ١٩٨٦ ) ومن هذه المواد والتي استخدمت في هذه الدراسة مادة SDS لتحييد بلازميدات بكتريا *S. epidermidis* وبكتريا *S. aureus* ، فبعد معاملة العزلات $SE_2$ و $SA_1$ لبكتريا *S. epidermidis* و *S. aureus* على التوالي ، بتراكيز مختلفة من SDS في الجدول ٤ – ١١ ، تم تحديد التركيز القاتل الذي تنعدم فيه البكتريا ٤٠ مايكروغرام / مليليتر ، وكان التركيز المثبط الادنى هو ٣٥ مايكروغرام / مليليتر .

**جدول ٤ – ١١ . تأثير المادة المحيدة SDS في العزلة $SE_2$ *S. epidermidis* والعزلة $SA_1$ *S. aureus***

| العزلة | التركيز ( مايكروغرام / مليليتر ) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ٥ | ١٠ | ١٥ | ٢٠ | ٢٥ | ٣٠ | ٣٥ | ٤٠ |
| $SE_2$ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + | - |
| $SA_1$ | ++++ | ++++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - |

الرموز : ++++ نمو عالٍ جداً ، +++ نمو عالٍ ، ++ نمو متوسط ، + نمو ضعيف ، - انعدام النمو .

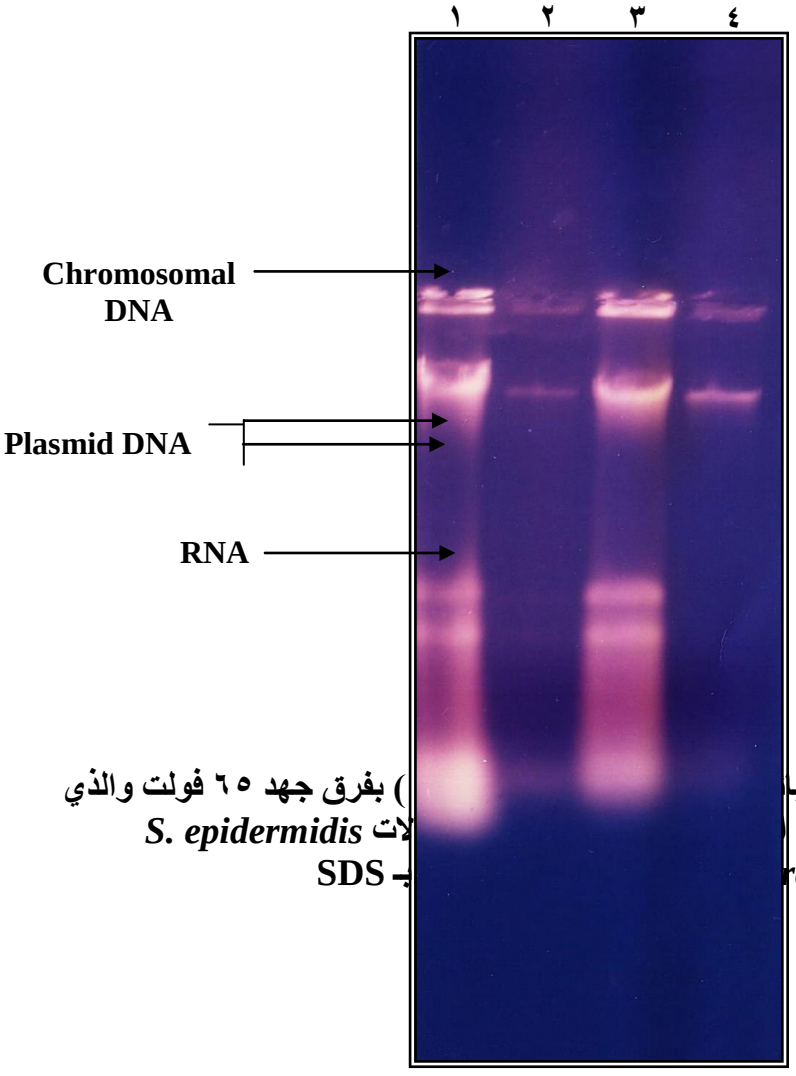
وبعد إجراء اختبار الحساسية للبنسلين ج والامبيسلين والاموكسيلين والامبيكلوكس على المستعمرات المُحيّدة المنتخبة $SE_2C$ و $SA_1C$ ، ومقارنتها مع العزلات الأصلية $SE_2$ و $SA_1$ ، لوحظ أن جينات المقاومة لهذه المضادات المذكورة آنفاً قد تم فقدانها عند معاملتهما بمادة SDS وبتراكيز ٢٠ و ٢٥ مايكروغرام / مليليتر للعزلتين $SE_2$ و $SA_1$ على التوالي . وبعد استخلاص الدنا البلازميدي لكِلا العزلتين والكشف عن حزم الدنا لوحظ اختفاء الحزم البلازميدية في العزلات المُحيّدة ، شكل ٤ – ٦ ، وفقدان هذه الحزم يشير إلى ارتباط الجينات الوراثية للمضادات الحيوية البنسلين ج والامبيسلين والاموكسلين والامبيكلوكس بالحزم البلازميدية المفقودة أي بمعنى آخر أنها محمولة على البلازميد ، تم إجراء فحص إنتاج إنزيم البيتالاكتميز لغرض التأكد والكشف عن إمكانية العزلات المحيدة $SE_2C$ و $SA_1C$ على إنتاج الإنزيم ، لوحظ أن العزلات قد فقدت قابليتها على الإنتاج وهذا يؤكد أن المورثات المشفّرة عن إنتاج البيتالاكتميز هي بلازميدية الموقع . وهذا ما أكدته نتائج دراسات أخرى التي أشارت إلى احتواء بعض سلالات *S. aureus* و *S. epidermidis* المقاومتين لمضاد البنسلين على بلازميدات مسؤولة عن إنتاج إنزيم البنسلينيز ومن ثم إضفاء صفة المقاومة لهذه السلالات عند تحييدها ( Harman and Baldwin, ١٩٦٤; Baldwin *et al.*, ١٩٦٩ ) .

وفي دراسة أخرى اجريت على عدة سلالات من *S. aureus* المقاومة للبنسلين والامبيسلين تبين احتواؤها على بلازميدات صغيرة الحجم ( ٤.٥ kb ) أو اقل تشفر عن صفة المقاومة ( Dyke and Noble, ١٩٨٤ ) .

أجرى Sonstein and Baldwin ( ١٩٧٢ ) دراسة مقارنة استخدم فيها ثلاثة عوامل مُحيّدة ( صبغة بروميد الاثيديوم ، SDS ودرجات الحرارة المرتفعة ) لتحييد بلازميدات بكتريا

*S. epidermidis* و *S. aureus* وذلك لمعرفة أي العوامل هي الأفضل والأكفأ في التحييد ، بينت نتائج الدراسة أن مادة SDS أعطت نسبة تحييد ١٠٠ % ، في حين أعطت صبغة بروميد الاثيديوم نسب تحييد ٢٦.٢ % و ١٦.٧ % عند الحضن بدرجات الحرارة المرتفعة .

وأشارت دراسات أخرى إلى استخدام الحرارة المرتفعة ( ٤٥ )°م لمدة ٤٨ ساعة واستعمال صبغة بروميد الاثيديوم في تحييد بلازميدات بكتريا *S. epidermidis* المقاومة للبنسلين ( Schaefler,١٩٧٢; Forbes and Schaberg, ١٩٨٣ ) ، وكذلك بالإمكان استخدام بعض المضادات الحيوية في التحييد مثل مضادي Coumermycin, Novobiocin ( Gellert *et al*., ١٩٧٦; Mchugh and Swartz, ١٩٧٧ ) .




**شكل ٤ – ٦ . الترحيل الكهربا ) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يظهر مواقع حزم الدنا لات *S. epidermidis* و *reus* – SDS**

المسار ١ : العزلة ***S. epidermidis*** SE٢ غير المحيدة
المسار ٢ : العزلة ***S. epidermidis*** SE٢ المحيدة
المسار ٣ : العزلة ***S. aureus*** SA١ غير المحيدة
المسار ٤: العزلة ***S. aureus*** SA١ المحيدة

# المصادر References

## أولاً : المصادر العربية

العنبكي ، ياسمين حسن علي ، ( ٢٠٠١ ) . دراسة علاقة بعض البكتريا الهوائية واللاهوائية لحب الشباب ومقاومتها لبعض المضادات الحياتية وبعض المعاملات . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

## ثانياً : المصادر الأجنبية

Al-Ameer, A.M. and Al-Akloby, O.M. (٢٠٠٢). Dermographic features and seasonal variations in patients with acne vulgaris in Saudi Arabia: A hospital – based study. Inter. J. Dermatol. **٤١ (١٢)**: ٨٧٠ – ٨٧٢.

Baird – Parker, A.C. (١٩٧٤). The basis for the recent classification of Staphylococci and Micrococci. Ann. N.Y. Acad. Sci. **٢٣٦**: ٧ – ١٤.

Baron, E.J.; Peterson, L.R. and Finegold, S.M. (١٩٩٥). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. "٩th ed". The C-V. Mosby Co. New York, U.S.A.

Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. and Turck, M. (١٩٦٦). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Cli. Path. **٣٦**: ٤٩٣ – ٤٩٦.

Baldwin, N.J.; Strickland, R.H. and Cox, M. (١٩٦٩). Some properties of the beta-lactamase genes in *Staphylococcus epidermidis*. Appl. Microbiol. **١٨**: ٦٢٨ – ٦٣٠.

Blair, C. and Lewis, C.A. (١٩٧٠). The Pigment of comedones. Br. J. Dermatol. **٨٢**: ٥٧٢ – ٥٨٣.

Blauer, M.; Vaalasti, A.; Pauli, S.L.; Ylikomi, T.; Joensuu, T. and Tuohimaa, P. (١٩٩١). Location of androgen receptor in human skin. J. Invest. Dermatol. **٩٧**: ٢٦٤ – ٢٦٨.

Bonfiglio, G. and Livermore, D.M. (١٩٩٤). β-Lactamase types amongst *Staphylococcus aureus* in relation to susceptibility to β-lactam inhibitor combinations. Antimicrobial. Chemother. **٣٣**: ٤٦٥ – ٤٨١.

Bouanchaud, D.; Scavizzi, M. and Chabbert, Y. (١٩٦٩). Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. J. Gen. Microbiol. **٥٤**: ٤١٧ – ٤٢٥.

Brook, I. and Frazier, E.H. (١٩٩١). Infections caused by *propionibacterium* species. Rev. Infect. Dis. **١٣**: ٨١٩ – ٨٢٢.

Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (١٩٩٨). In: Jawetz, Melink and Adelberg's Medical Microbiology, "٢١th ed". Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (eds.), Appleton and Lang, California, P. ١٩٠ – ٢٦٦.

Brown, A.G.; Butterworth, D.; Cole, M.; Hanscomb, G.; Hood, J. D. and Reading, C. (١٩٧٦). Naturally – occurring β-lactamase inhibitors with antibacterial activity. J. Antibiotic. **٢٩**: ٦٦٨ – ٩.

Brown, S.K. and Shalita, A.R. (١٩٩٨). Acne vulgaris. Lancet. Re. **٣٥١ (٩١١٩)**: ١٨٧١ – ١٨٧٦.

Bruns, W. and Kepleler, H. (١٩٨٧). Extracellular and membrane- bound β-lactamase of *Staphylococcus aureus*: Their importance for the expression of penicillin resistance. J. Med. Microbiol. **٢٣**: ١٣٣ – ١٣٩.

Burkhart, C.N. (٢٠٠٣). Clinical assessment of acne pathogenesis with treatment implications. International Pediatrics. **١٨ (١)**: ١٤ – ١٩.

Burton, J.L.; Cunliffe, W.J. and Stafford, I. (١٩٧١). The prevalence of acne vulgaris in adolescence. Br. J. Dermatol. **٨٥ (٢)**: ١١٩ – ١٢٦.

Bush, K.; Jacoby, G.A. and Mederios, A.A. (١٩٩٥). A functional classifications scheme for β-lactamases and its correlations with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٩ (٦)**: ١٢١١ – ١٢٣٣.

Chan, J.J. and Rohr, J.B. (٢٠٠٠). Acne vulgaris: Yesterday, today and tomorrow. Aust. J. Dermatol. **٤١ (٤)**: ٦٩ – ٧٢.

Choudhry, R.; Hodgins, M.B.; Van-der-Kwast, T.H.; Brinkmann, A.O. and Boersma, W.J. (١٩٩٢). Location of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: Implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. J. Endocrinol. **١٣٣**: ٤٦٧ – ٤٧٥.

Christansen, G.D.; Baddour, L.M. and Simpson, W.A. (١٩٨٧). Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in *vitro* and in *vivo*. Infect. Immun. **٥٥**: ٢٨٧٠ – ٢٨٧٧.

Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (١٩٨٢a). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. **٣٧ (١)**: ٣١٨ – ٣٢٦.

Christensen, G.D.; Bisno, A.L. Parisal, J.T.; McLaughlin, B.; Hester, M.G. and Luther, R.W. (١٩٨٢b). Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis*. Ann. Intern. Med. **٩٦**: ١ – ١٠.

Christensen, G.D.; Parisi, J.T.; Bisno, A.L.; Simpson, W.A. and Beachey, E.H. (١٩٨٣). Characterization of clinically significant strain of coagulase – negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol. **١٨ (٢)**: ٢٥٨ – ٢٦٩.

Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Metton, D.M. and Beachey, E.H. (١٩٨٥). Adherence of coagulase – negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical device. J. Clin. Microbiol. **٢٢**: ٩٩٦ – ١٠٠٦.

Clowes, R.C. (١٩٧٢). Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol. Rev. **٣٦ (٣)**: ٣٦١ – ٤٠٥.

Coates, P.; Vyakrnam, S.; Eady, E.A.; Jones, C.E.; Cove, J.H. and Cunliffe, W.J. (٢٠٠٢). Prevalence of antibiotic – resistant *Propionibacterium* on the skin of acne patients: ١٠ – years surveillance data and snapshot distribution study Br. J. Dermatol. **١٤٨ (٢)**: ٣٦٥ – ٣٦٧.

Cohen, S.N.; Chang, A.C. and Hsu, L. (١٩٧٢). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **٦٩ (٨)**: ٢١١٠ – ٢١١٤.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmian, B.P. and Simmons A. (١٩٩٦). Practical Medical Microbiology "١٤th ed.". The Churchill Livingstone. Inc., New York, U.S.A.

Collins, C.H. and Lyne, P.M. (١٩٨٧). Microbiological methods. "٥th ed.". London.

Cramtone, S.E.; Gerke, C.; Schnell, N.F.; Nichols, W.W. and Gotz, F. (١٩٩٩). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun. ٦٧: ٥٤٢٧ – ٥٤٣٣.

Crawford, W.W.; Crawford, I.P.; Stoughton, R.B. and Cornell, R.C. (١٩٧٩). Laboratory induction and clinical occurrence of combined clindamycin and erythromycin resistance in *Cornyebacterium acnes*. J. Invest. Dermatol. ٧:١٨٧ – ١٩٠.

Cruickshank, R.; Duguid, J.R.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. (١٩٧٥). Medical Microbiology. "١٢th ed.". Vol. ٢, Churchill Livingstone. New York, U.S.A., PP. ٤٥٤ – ٤٦١.

Cunliffe, W.J. and Goulden, V. (٢٠٠٠). Phototherapy and acne vulgaris. Br. J. Dermatol. ١٤٢: ٨٥٣ – ٨٥٦.

Cunliffe, W.J. and Holland, K.T. (١٩٨٩). Clinical and laboratory studies on treatment with ٢٠ % azelaic acid cream for acne. Acta. Derm. Venereol. ١٤٣: ٣١ – ٣٤.

Darley, C.R.; Currey, H. and Barker, H. (١٩٧٨). Acne fulminans with arthritis in identical twins treated with isotretinoin. J. R. Soc. Med. ٧٧: ٣٢٨ – ٣٠.

Dassy, B.; Hogan, T.; Foster, T.J. and Fournier, J.M. (١٩٩٣). Involvement of the accessory gene regulator in expression of type ٥ capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. **١٣٩**: ١٣٠١ – ١٣٠٦.

Douglas, H.C. and Gunter, S.E. (١٩٤٦). The Taxonomic position of *Corynebacteruim acnes*. J. Bacteriol. **٥٢ (١)**: ١٥ – ٢٣.

Douri, F.E. (١٩٩٧). Clinical and microbiological study of acne in Iraqi patients. M.Sc. Thesis, College of Medicine, University of Baghdad.

Dreno, B.; Reynaud, A.; Moyse, D.; Habert, H. and Richet, H. (٢٠٠١). Erythromycin – resistance of coetaneous bacterial flora in acne. Eur. Dermatol. **١١**: ٥٤٩ – ٥٥٣.

Dyke, K.G.H. and Noble, W.C. (١٩٨٤). Plasmids of phage – group II *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. **١٧**: ٣٢٥ – ٣٣٤.

Eady, E.A. and Johnson, J.L. (١٩٩٤). *Propionibacterium acnes* –friends or Foe ? Rev. Med. Microbiol. **٥**: ١٦٣ – ١٧٣.

Eady, E.A.; Cove, J.H.; Holland, K.T. and Cunliffe, W.J. (١٩٨٩). Erythromycine resistant *Propionibacteria* in antibiotic treated acne patients: Association with therapeutic failure. Br. J. Dermatol. **١٢١**: ٥١ – ٥٧.

Eady, E.A.; Jones, C.E.; Grandner, K.J.; Taylar, J.P.; Cove, J.H. and Cunliffe, W.J. (١٩٩٣). Tetracycline – resistant *Propionibacteria* for patients are cross – resistant to doxycycline, but sensitive to minocycline. Br. J. Dermatol. **١٢٨**: ٥٥٦ – ٥٦٠.

Ehrlich, S.D. (١٩٧٧). Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **٧٤ (٤)**: ١٦٨٠ – ١٦٨٢.

Evans, R.C. and Holmes, C.J. (١٩٨٧). Effect for vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastrome. Antimicrob. Agents Chemother. **٣١**: ٨٨٩ – ٨٩٤.

Faraj, A.H. (١٩٨٩). The role of different microorganisms in acne. M. Sc. Thesis, University of Baghdad.

Farrell, A.M.; Foster, T.J. and Holland, K.T. (١٩٩٣). Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. **١٣٩**: ٢٦٧ – ٢٧٧.

Federman, M.D. and Kirsner, M.D. (٢٠٠٠). Acne vulgaris: Pathogenesis and therapeutic approach. The American Journal of Managed Care. **٦ (١)**: ٧٨ – ٨٦.

Feldman, S.M.D.; Rachele, E.; Careccia, M.D.; Kelly, L.; Barham, M.D. and Hancox, J.M.D. (٢٠٠٤). Diagnosis and treatment of acne.

American Family Physician. ٦٩ **(٩)**: ٢١٣٥ – ٢١٤٠.

Finch, R.C. (١٩٨١). Antibacterial chemotherapy. International Medicine. ١ **(٣)**: ٩٦ – ١٠١.

Firth, N.; Apisiridej, S.; Berg, T.; O'Rourke, B.A.; Curnock, S.; Dyke, K.G.H. and Skurray, R.A. (٢٠٠٠). Replication of *Staphylococcal* multiresistance plasmid. J. Bacteriol. ١٨٢ **(٨)**: ٢١٧٠ – ٢١٧٨.

Foley, J.M. and Perret, C.J. (١٩٦٢). Screening bacterial colonies for penicillinase production. Nature. ١٩٥: ٢٨٧ – ٢٢٨.

Forbes, B.A. and Schaberg, D.R. (١٩٨٣). Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: Evidence for conjugative exchange of resistance. Bacteriol. ١٥٣ **(٢)**: ٦٢٧ – ٦٣٤.

Funke, G.; Graevenitz, A.V.; Clarridge, J.E. and Bernard, K.A. (١٩٩٧). Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin. Microbiol. Rev. ١٠: ١٢٥ – ١٥٩.

Gellert, M.; O'Dea, M.H.; Itoh, T. and Tomizawa, J. (١٩٧٦). Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. ٧٣: ٤٤٧٤ – ٤٤٧٨.

Gillespie, M.T.; May, J.W. and Skurray, R.A. (١٩٨٦). Detection of an integrated Tetracycline Resistance plasmid in the chromosome of methicillin – resistance *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. ١٣٢ **(٦)**: ١٧٢٣ – ١٧٢٨.

Goldenberg, D.L. and Reed, J.I. (١٩٨٥). Bacterial arthritis. N. Engl. J. Med. ٣١٢: ٧٦٤ – ٧٧١.

Gonzalez, T.; Gantes, M. and Bustabed, S. (١٩٨٥). Acne fulminans associated with arthritis monozygotic twins. J. Rheumatol. ١٢: ٣٨٩ – ٩١.

Goodman, G.J. (٢٠٠١). Post-acne scarring: A short review of its pathophysiology. Aus. J. Dermatol. ٤٢ **(٢)**: ٨٤ – ٩٠.

Goolamali, K. and Adison, A.C. (١٩٧٧). The origin and use of word acne. Br. J. Dermatol . ٩٦: ٢٩١ – ٢٩٤.

Goulden, V.; Clark, S. and Cunliffe, W. (١٩٩٧). Post – adolescent acne: A review of clinical features. Br. J. Dermatol. ١٣٦: ٦٦ – ٧٠.

Goulden, V.; McGeon, C.H. and Cunliffe, W.J. (١٩٩٩). The familial risk of adult acne: A Comparison between first – degree relatives of affected and unaffected individuals. Br. J. Dermatol. ١٤١: ٢٩٧ – ٣٠٠.

Greenman, J.; Halland, K.T. and Cunliffe, W.J. (١٩٨٣). Effects of pH on biomass, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous *Propionibacteria* grown continuous culture. J. Gen. Microbiol. ١٢٩: ١٣٠١ – ١٣٠٧.

Groves, D.J. (١٩٧٩). Interspecific relationships of antibiotic resistance in *Staphylococcus* sp.: Isolation and comparison of plasmids determining tetracycline resistance in *S. aureus* and *S. epidermidis*. Can. J. Microbiol. **٢٥**: ١٤٦٨ – ١٤٧٥.

GryCzan, T.J.; Contente, S. and Dubnau, D. (١٩٧٨). Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **١٣٤**: ٣١٨ – ٣٢٩.

Guldager, H. (١٩٨٧). Halothane allergy as cause of acne. Lancet. **١**: ١٢١١ – ١٢.

Gupta, M.A. and Gupta, A.K. (١٩٩٨). Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atropic dermatitis and psoriasis. Br. J. Dermatol. **١٣٩**: ٨٤٦ – ٨٥٠.

Guttman, C. (١٩٩٩). Acne – related conditions differ with black patients. Dermatol. Times. **٩٩ (٢٠)**: ١ – ٢٣.

Guy, R. and Keatey, T. (١٩٩٨). Modelling in acne. Dermatol. **١٩٦**: ٣٢ – ٣٧.

Hanahan, D. (١٩٨٣). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **١٦٦**: ٥٥٧ – ٨٠.

Hanahan, D.; Jesse, J. and Bloow, F.R. (١٩٩٦). Techniques for transformation of *E. coli*, In: DNA cloning, core techniques a practical APPROACH. (ed. Glover, D.M. and Hams, B.D.) information, Press Ltd. Enyshum. Oxon.

Harkaway, K.S.; McGinley, K.J and Foglia, A.N. (١٩٩٢). Antibiotic resistance patterns in coagulase–negative Staphylococci after treatment with topical erythromycin, benzoyl peroxide, and combination therapy. Br. J. Dermatol. **١٢٦**: ٥٨٦ – ٥٩٠.

Harly, J.P. and Prescott, L.M. (١٩٩٦). Laboratory exercises in microbiology, "٣rd ed.". WCB. McGraw Hill, New York.

Harman, S.A. and Baldwin, J.N. (١٩٦٤). Nature of the determinate controlling penicillinase production in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **٨٧**: ٥٩٣ – ٥٩٧.

Harryigan, W.F. and Mafacne, M.E. (١٩٧٦). Laboratory method in food and dairy microbiology. Academic Press. Inc. London.

Hashimoto, H.; Kono, K. and Mitsuhashi. (١٩٦٤). Elimination of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* treatment with acriflavine. Bacteriol. **٨٨ (١)**: ٢٦١ – ٢٦٢.

Hedstrom, S.A. and Nilsson – Ehle, P. (١٩٨٣). Triacylglycerol lipolysis by *Staphylococcus aureus* strains from furunculosis, pyomosititis, impetigo and osteomyelitis. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. Microbiol. **٩١**: ١٦٩ – ١٧٣.

Higaki, S.; Morimatsu, S.; Morohashi, M.; Yamagishi, T. and Hasegawa, Y. (١٩٩٧). Susceptibility of *Propionibacterium acnes*,

*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to ١٠ kampo formulations. J. Int. Med. Res. **٢٥ (٦)**: ٣١٨ – ٢٤.

Hogt, A.H.; Dankert, J. and Feijen, J. (١٩٨٣). Encapsulation, slime production and surface hydrophobicity of coagulase – negative Staphylococci. FEMS Microbiol. Lett. ١٨: ٢١١ – ٢١٥.

Hogt, A.H.; Dankert, J.; Hulstaert, C.E. and Feijen, J. (١٩٨٦). Cell surface characteristics of coagulase – negative staphylococci and their adherence to flourinated Poly - (Ethylenepropylene). Infect. Immun. ٥١: ٢٩٤ – ٣٠١.

Holmes, R.L.; Williams, M. and Cunliffe, W.J. (١٩٧٢). Pliosebaceous duct obstruction and acne. Br. j. Dermatol. ٨٧: ٣٢٧ – ٣٢.

Holt, J.G.; Kreig, N.R. Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (١٩٩٤). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. "٩th ed.". Williams and Wilkins Co. Baltimore, London.

Hull, S.I.; Hull, R.A.; Mishew, B.H. and Falcow, S. (١٩٨٢). Genetics of hemolysin of *E. coli*. J. Bacteriol. ١٥١: ١٠٠٦ – ١٠١٢.

Ingham, E.; Eady, E.A.; Goodwin, C.E.; Cove, J. H. and Cunliffe, W.J. (١٩٩٢). Pro-inflammatory levels of interleukin -١ α-like bioactivity are present in the majority of open comedones in acne vulgaris. J. Invest. Dermatol. ٩٨: ٨٩٥ – ٩٠١.

Ingham, E.; Holland, K.T.; Gowland, K.T. and Cunliffe, W.J. (١٩٨١). Partial purification and characterization of lipase ($EC_{٣}$ ١.١.٣) from *Propionibacterium acnes*. J. Gen. Microbiol. ١٢٤: ٣٩٣ – ٤٠١.

Iordanescu, A.; Surdeanu, M.; Latta, P.D. and Novick, R. (١٩٧٨). Incompatibility and molecular relationships between small Staphylococcal plasmids carrying the same resistance markers. Plasmid. ١: ٤٦٨ – ٤٧٩.

Iordanescu, S. (١٩٧٦). Three distinct plasmids originating in the same *Staphylococcus aureus* strain. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. ٣٥: ١١١ – ١١٨.

Iordanescu, S. (١٩٧٧). Relationships between contransducible plasmids in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. ١٢٩: ٧١ – ٧٥.

Jaffe, H.W.; Sweeney, H.M.; Nathan, C.; Welnstein, R.A.; Kabins, S.A. and Cohen, S. (١٩٨٠). Identity and interspecific transfer of gentamycin – resistance plasmids in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. ١٤١: ٧٣٨ – ٧٤٧.

Jaffe, H.W.; Sweeney, H.M.; Welnstein, R.A.; Kabins, S.A.; Nathan, C. and Cohen, S. (١٩٨٢). Structural and phenotypic varieties of gentamycin resistance plasmid in hospital strains of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. ٢١: ٧٧٣ – ٧٧٩.

James, S.L. (١٩٧٥). Pathogenesis of acne vulgaris. Int. J. Dermatol. ١٥: ٤٩٠ – ٤٩٥.

Jappe, U. (٢٠٠٣). Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy. Acta. Dermato – Venereol. **٨٣ (٤)**: ٢٤١ – ٢٤٨.

Jawetz, E.; Melnick, J. and Adelberg, E.A. (١٩٩٨). Medical Microbiology, "٢١ ed.". Langemedical Publications. California.

Johnson, J.L. and Cummns. (١٩٧٢). Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical *Propionibacteria* and strains of Arachnia Propionica. J. Bacteriol. **١٠٩ (٣)**: ١٠٤٧ – ١٠٦٦.

Jahnston, J.H. and Richmond, M.H. (١٩٧٠). The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. J. Gen. Microbiol. **٦٠**: ١٣٧ – ١٣٩.

Karch, H.; Russmann, H.; Schmidt, H.; Schwar, Z.K. and Heesemann, J. (١٩٩٥). Long-term shedding and clonal turnover of EHEC ٠١٥٧ in diarrhea disease. J. Clin. Microbiol. **٣٣**: ١٦٠٢.

Kerkemeyer, K. (٢٠٠٥). Acne vulgaris. Plastic surgical nursing. **٢٥ (١)**: ٣١ – ٣٥.

Kernodle, D.S.; Zygmunt, D.J.; McGrow, P.A. and Chipley, J.R. (١٩٩٠). Purification of *Staphylococcus aureus* β-lactmases by using sequential cation – exchange and affinity chromatography. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٤ (١١)**: ٢١٧٧ – ٢١٨٣.

Kilkenny, M.; Merlin, K.; Plunkett, A. and Marks, R. (١٩٩٨). The prevalence of common skin conditions in Australian school students: ٣. Acne vulgaris. Br. J. Dermatol. **١٣٩ (٥)**: ٨٤٠ – ٨٤٥.

Kjeldstal, B. (١٩٨٤). Photoinactivation of *Propionibacterium acnes* by near ultraviolet light. Znaturforsch. **٣٩**: ٣٢٩ – ٣٥.

Kligman, A.M. (١٩٧٩). Acne. J. Invest. Dermatol. ٧٣: ٤٣٤ – ٤٤٢.

Kloos, W.E. and Bannerman, T.L. (١٩٩٤). Update on clinical significance of coagulase – negative Staphylococci, Clin. Microbiol. Rev. ٧: ١١٧ – ١٤٠.

Kloos, W.E. and Musselwhite, M.S. (١٩٧٥). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl. Microbiol. **٣٠**: ٣٨١ – ٣٩٥.

Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (١٩٧٥). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. Clin. Microbiol. **١ (١)**: ٨٢ – ٨٨.

Knobloch, J.K.M.; Bartscht, K.; Sabottke, A.; Rohde, H.; Feucht, H.H. and Mack, D. (٢٠٠١). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *SigB* Operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. J. Bacteriol. **١٨٣ (٨)**: ٢٦٢٤ – ٢٦٣٣.

Kurokawa, I.; Nishijima, S. and Asada, Y. (١٩٨٨). The antibiotic sensitivity of *Propionibacterium acnes*: A ١٥ year bacteriological study and retrospective evaluation. J. Dermatol. **١٥**: ١٤٩ – ١٥٤.

Lacey, R.W. (١٩٧٥). Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bacteriol. Rev. **٣٩**: ١ – ٣٢.

Lacey, R.W.; Alder, V.G. and Gillespie, W. (١٩٧٠). The survival of *Staphylococcus aureus* on human skin: An investigation using mixed cultures. Br. J. Exp. Pathol. **٥١**: ٣٠٥ – ٣١٣.

Lacey, R.W.; Lewis, E.L. and Rosdahl, V.T. (١٩٧٤). Evolution of plasmids in *vivo* in a strain of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. **٧**: ١١٧ – ١٢٥.

Leelaporn, A.; Firth, N.; Paulsen, I.T. and Skurray, R.A. (١٩٩٦). IS٢٥٧ – mediated co integration in the evaluation of a family of Staphylococcal trimethoprim resistance plasmids. J. Bacteriol. **١٧٨ (٢٠)**: ٦٠٧٠ – ٦٠٧٣.

Leelaporn, A.; Firth, N.; Paulsen, I.T.; Hettiaratchi, A. and Skurray, R.A. (١٩٩٥). Multidrug resistance plasmid PSK١٠٨ from coagulase–negative Staphylococci: relationship to *Staphylococcus aureus* qacC plasmids. Plasmid. **٣٤**: ٦٢ – ٦٧.

Leelaporn, A.; Paulsen, I.T.; Tennent, J.M.; Littlejohn, T.G. and Skurray, R.A. (١٩٩٤). Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase – negative Staphylococci. J. Med. Microbiol. **٤٠**: ٢١٤ – ٢٢٠.

Leeming, J.P.; Holland, K.T. and Cunliffe, W.J. (١٩٨٥). The pathological ecological significance of microorganisms colonizing acne vulgaris comedones. J. Med. Microb. **٢٠**: ١١ – ١٦.

Leeming, J.P.; Holland, K.T. and Cunliffe, W.J. (١٩٨٨). The Microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions. Br. J. Dermatol. **١١٨**: ٢٠٣ – ٢٠٨.

Lema, M.W.; Brown, A. and Calkins, J.H. (١٩٩٤). A general method for extraction of DNA from Bacteria. J. Microbiol. Meth. **١٩**: ١٦٧ – ١٧٢.

Level, L. and Marks, R. (١٩٩٠). Current views on the aetiology, pathogenesis, and treatment of acne vulgaris. Drugs. **٣٩**: ٦٨١ – ٩٢.

Leyden, J.J. (١٩٨٣). Retinoids and acne. J. Am. Acad. Dermatol. **١٩**: ١٦٤ – ٦٨.

Leyden, J.J. and Shalita, A.R. (١٩٨٦). Rational therapy for acne vulgaris: An update on topical treatment. J.AM. Acad. Dermatol. **١٥**: ٩٠٧ – ٩١٤.

Leyden, J.J. McGinley, K.J.; Cavalieri, S.; Webster, G.F.; Mills, O.H. and

Kligman, A.M. (١٩٨٣). *Propionibacerium acnes* resistance to antibiotics in acne patients. J. Am. Acad. Dermatol. ٨: ٤١ – ٤٥.

Leyden, J.J.; Berger, R.S.; Dunlap, F.E.; Ellis, C.N.; Connolly, M.A. and Levy, S.F. (٢٠٠١). Comparison of the efficacy and safety of a combination topical gel formulation of benzol peroxide and clindamycin with benzol peroxide, clindamycin and vehiche gel in the treatments of Acne vulgaris. Am. J. Clin. Dermatol. **٢ (١)**: ٣٣ – ٣٩.

Leyden, J.J.; McGinley, K.; Mills, O.H. and Kligman, A.M. (١٩٨٠). Topical antibiotic and topical antimicrobial agents in acne therapy. Acta. Dermatol. Venerol. **٨٩**: ٧٥ – ٨١.

Lindberg, M. and Novick, R.P. (١٩٧٣). Plasmid – specific transformation in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **١١٥**: ١٣٩ – ١٤٥.

Lindberg, M.; Sjöström, J.E. and Johansson, T. (١٩٧٢). Transformation of chromosomal and plasmid characters in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **١٠٩**: ٨٤٤ – ٨٤٧.

Livermore, D.M. (١٩٩٥). β-Lactamase in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. **٨ (٤)**: ٥٥٧ – ٥٨٤.

Longshow, C.M.; Farrell, A.M. Wright, J.D. and Holland, K.T. (٢٠٠٠). Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: Comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. Microbiol. **١٤٦**: ١٤١٦ – ١٤٢٧.

Lucky, A.W.; Biro, F. and Huster, G. (١٩٩٤). Acne vulgaris in premenarchal girls. Arch. Dermatol. **١٣٠**: ٣٠٨ – ٣١٤.

Lucky, A.W.; Biro, F.M. and Huster, G.A. (١٩٩١). Acne vulgaris in early adolescent boys: Correlations with pubertal maturation and age. Arch. Dermatol. **١٧٢**: ٢١٠ – ٢١٦.

Lyon, B.R. and Skurray, R. (١٩٨٧). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basic. Microbiol. Rev. **٥١ (١)**: ٨٨ – ١٣٤.

MacFaddin, J.E. (٢٠٠٠). Biochemical test for identification of medical bacteria. "٣rd ed.". Lippin Cott Williams and Wilkins. Philadelphia, U.S.A.

Males, B.M.; Rogers, W.A. and Parisi, J.T. (١٩٧٥). Virulence factors of biotypes of *Staphylococcus epidermidis* from clinical sources. J. Clin. Microbiol. **١ (٣)**: ٢٥٦ – ٢٦١.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; and Sambrook, J. (١٩٨٢). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory. Cold spring Harbor, New York.

Marples, R.R. and Izumi, A.K. (١٩٧٠). Bacteriology of pustular acne. J. Invest. Dermatol. **٥٤ (٢)**: ٢٥٢ – ٢٥٥.

May, J.W.; Houghton, R.H. and Perret, C.J. (١٩٦٤). The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of

*Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. ٣٧: ١٥٧ – ١٦٩.

McDowell, A.; Valanne, S.; Ramage, G.; Tunney, M.M.; Glenn, J.V.; McLorinan, J.F.; Lodes, M.; Persing, D. and Patrick, S. (٢٠٠٥). *Propionibacterium acnes* Types I and II represent phylogenetically distinct groups. J. Clin. Microbiol. **٤٣ (١)**: ٣٢٦ – ٣٣٤.

Mchugh, G.L. and Swartz, M.N. (١٩٧٧). Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin. Antimicrob. Agents Chemother. **١٢ (٣)**: ٤٢٣ – ٤٢٦.

Melntosh, I.J.; Hong, K.F. and Sapolsky R.M. (١٩٩٨). Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in brain: Baseline studies. Brain – Res. **٧٩١ (١ – ٢)**: ٢٠٩ – ١٤.

Mengesha, Y.M. and Hansen, R.C. (١٩٩٩). Toddler – age nodulocystic acne. J. Pediatr. **١٣٤ (٥)**: ٦٤٤ – ٦٤٨.

Meyers, J.A. Sanchez, D.; Elwell, L.P. and Falkow, S. (١٩٧٦). Simple agarse gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. ١٢٧: ١٥٢٩ – ١٥٣٧.

Mills, O.H. and Kilgman, A.M. (١٩٧٨). Ultraviolet phototherapy and photochemotherapy of acne vulgaris. Arch. Dermatol. ١١٤: ٢٢١ – ٢٢٣.

Miskin, J.E.; Farrell, A.M.; Cunliffe, W.J. and Holland, K.T. (١٩٩٧). *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid – rich human skin, produces a ٣٣KDa extracellular lipase encoded by *gehA*. Microbiol. ١٤٣: ١٧٤٥ – ١٧٥٥.

Mitsuhashi, S.; Morimura, M.; Kono, K. and Oshima, H. (١٩٦٣). Elimination of drug resistance of *Staphylococcus aureus* by treatment with acriflavine. Bacteriol. **٨٦ (١)**: ١٦٢ – ١٦٤.

Muller, E.; Hubner, J.; Gutierrez, N.; Takeda, S.; Goldmann, D.A. and Peir, G.B. (١٩٩٣). Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide / adhesion and slime. Infect. Immun. ٦١: ٥٥١ – ٥٥٨.

Naidoo, J. and Noble, W.C. (١٩٨٧). Skin as a source of transferable antibiotic resistance in coagulase – negative staphylococci. Zentrabatt Bakt Suppl. ١٦: ٢٢٥ – ٢٣٤.

NCCLS (١٩٩٠). National Committee For Clinical Laboratory Standards Performance For Antimicrobic Susceptibility Testing.

Nguyen, Q.H. and Alyssa, K.Y. (١٩٩٤). Management of acne vulgaris. American Family Physician. **٥٠ (١)**: ٨٩ – ٩٦.

Nishijima, S.; Akamatsu, H.; Akamatus, M.; Kurokawa, I. and Asada, Y. (١٩٩٤). The antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*

and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne. J. Dermatol. **٢١ (٣)**: ١٦٦ – ١٧١.

Nishijima, S.; Kurokawa, I.; Katoh, N. and Watanabe, K. (٢٠٠٠). The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesion. J. Dermatol. **٢٧ (٥)**: ٣١٨ – ٣٢٣.

Noble, W.C. and Naidoo, J. (١٩٧٨). Evolution of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: The role of the skin. Br. J. Dermatol. **٩٨**: ٤٨١ – ٤٨٩.

Novick, R. Sanchez – Rivas, C.; Gruss, A. and Edelman, I. (١٩٨٠). Involvement of the cell envelope in plasmid maintenance: Plasmid curing during the regeneration of protoplasts. Plasmid. **٣**: ٣٤٨ – ٣٥٨.

Novick, R.P. (١٩٦٩). Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol. Rev. **٣٣**: ٢١٠ – ٢٣٥.

O'Reilly, M.G.; Foster, T.J. and Arbuthnott, J.P. (١٩٨١). Plasmids in epidermolytic strains of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. microbiol. **١٢٤**: ٩٩ – ١٠٧.

Palatsi, R. and Oikarinena, A. (١٩٧٩). Hormonal analysis and delayed hypersensitivity in identical twins with sever acne. Acta. Derm. Venereol. **٥٩**: ١٥٧ – ٦٠.

Parisi, J.T.; Robbins, Lampson, B.C. and Hecht, D.W. (١٩٨١). Characterization of amacrolide, lincosamide, and streptogramin resistance plasmid in *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. **١٤٨**: ٥٥٩ – ٥٦٤.

Perret, G.J. (١٩٥٤). Iodometric assay of penicillinase. Nature. **١٧٤ (٤٤٣٩)**: ١٠١٢ – ١٠١٣.

Pfaller, M.A. and Herwaldt, L.A. (١٩٨٨). Laboratory, clinical and epidemiological aspects of a coagulase – negative Staphylccocci. Clin. Microbiol. Rev. **١**: ٢٨١ – ٢٩٩.

Pochi, P.E. and Strauss, J.S. (١٩٦٤). Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. J. Invest. Dermatol. **٤٣**: ٣٨٣ – ٣٨٨.

Pochi, P.E.; Shalita, A.R.; Strauss, J.S.; Webster, S.B.; Cunliffe, W.J. and Katz, H.I. (١٩٩١). Report of the consensus conference on acne classification. Washington, D.C., March ٢٤ and ٢٥, ١٩٩٠. Am. Acad. Dermatol. **٢٤**: ٤٩٥ – ٥٠٠.

Pospiech, J. and Neuman, T. (١٩٩٥). Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA (ed. Kieser, T) Norwich, U.K.

Puhvel, S.M. and Sakamato, M. (١٩٧٨). The Chemoattractant properties of comedonal components. J. Invest. Dermatol. **٧١**: ٣٢٤ – ٣٢٩.

Ray, L.F. and Robert, E.K. (١٩٧٠). *Corynebacterium acnes* from human skin. Arch. Dermatol. **١٠١**: ٣٦ – ٤٠.

Rehberger, T.G. and Glotz, R.A. (١٩٩٠). Characterization of *Propionibacterium* plasmids. Appl. Environ. Microbiol. **٥٦ (٤)**: ٨٦٤ – ٨٧١.

Roberts, M.C. (١٩٩٦). Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS. Microbiol. Rev. **١٩**: ١ – ٢٤.

Rosdahl, V.T.; Jarloev, J.O. and Knudsen, A.M. (١٩٨٦). β-lactamase production in coagulase – negative micrococceae. Acta. Pathological et Microbiologica Scandinavica B. **٩٤**: ٤٢٣ – ٧.

Ross, J.I.; Carnegie, E.; Snelling, A.M.; Coates, P.; Cove, J.H. and Eady, E.A. (٢٠٠١). Prevalence of antibiotic resistant *Propionibacteria* on the skin of acne patients from six European countries. JEADV. **٢**: ١٣٥ – ١٤٠.

Rossen, M.H. and Roed – Petersen, J. (١٩٩٣). Acne vulgaris. ugeskrlaeger. **١٥٥ (١١)**: ٧٧٥ – ٧٧٨.

Rudin, L.; Sjöström, J.E. and Philipson, L. (١٩٧٤). Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **١١٨**: ١٥٥ – ١٦٤.

Rudy, S.J. (٢٠٠٣). Overview of the evaluation and management of acne vulgaris electronic version. Pediatric Nurse. **٢٩ (٤)**: ٢٨٧ – ٢٩٥.

Ruppy, M.E. and Archer, G.L. (١٩٩٤). Coagulase – negative Staphylococci: Pathogens associated with medical progress. Clin. Infect. Dis. **١٩**: ٢٣١ – ٢٤٥.

Rush, M.G.; Gordon, C.N.; Novick, R. P. and Warner, R.C. (١٩٦٩). Penicillinase plasmid DNA from *Staphylococcus aureus*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **٦٣**: ١٣٠٤ – ١٣١٠.

Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (١٩٨٩). Molecular cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sanders, C.C. (١٩٩٢). β-lactam of Gram-negative bacteria: New challenge for new drugs. Clin. Infect. Dis. **١٤**: ١٠٨٩ – ١٠٩٩.

Schaefler, S. (١٩٧٢). Polyfunctional penicillinase plasmid in *Staphylococcus epidermidis*: Bacteriophage restriction and modification mutants. Bacteriol. **١١٢ (٢)**: ٦٩٧ – ٧٠٦.

Schnappinger, D. and Hillen, W. (١٩٩٦). Tetracyclines: antibiotic action, up-take, and resistance mechanisms. Arch. Microbiol. **١٦٥**: ٣٥٩ – ٣٦٩.

Seukeran, D.C. and Cunliffe, W.J. (١٩٩٨). Acne vulgaris in the elderly: The response to low-dose isotretinoin. Br. J. of Derm. **١٣٩**: ٩٩ – ١٠١.

Shaffrman, A.; Shalita, Z.A. and Hertman, I. (١٩٧٨). Cleavage maps of a tetracycline plasmid from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **١٣٤**: ٣٤٥ – ٣٤٨.

Shalita, A.R. and Lee, M.L. (١٩٨٣). Inflammatory acne. Dermatol. clin. ١: ٣٦١ – ٦٤.

Sharpe, G.R. (١٩٩٥). Prescribing for acne vulgaris. Prescriber's J. **٣٥ (٢)**: ٥٣ – ٥٨.

Sheagren, J.N. (١٩٨٤). *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen. N. Engl. J. Med. ٣١٠: ١٣٦٨ – ١٣٧٣.

Sigurdsson, V.; Knulst, A.C. and Van Weelden, H. (١٩٩٧). Phototherapy of acne vulgaris with visible light. Dermatol. ١٩٤: ٢٥٦ – ٦٠.

Sjöström, J.E.; Lofdashl, S.E. and Philipson, L. (١٩٧٩). Transformation of *Staphylococcus aureus* by heterologous plasmids. Plasmid. ٢: ٥٢٩ – ٥٣٥.

Smith, K. and Novick, R.P. (١٩٧٢). Genetic studies on plasmid–linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. ١١٢: ٧٦١ – ٧٧٢.

Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (١٩٨٦). Bergeye's Manual of systemic bacteriology. Vol. ٢. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

Solar, G.D.; Giraldo, R.; Ruiz-Echevarria. Espinosa, M. and Diaz-orejas, R. (١٩٩٨). Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. Molecular Biol. Rev. **٦٢ (٢)**: ٤٣٤ – ٤٦٤.

Sonstein, S.A. and Baldwin, J.N. (١٩٧٢). Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. Bacteriol. **١٠٩ (١)**: ٢٦٢ – ٢٦٥.

Stathakis, V.; Kilkenny, M. and Marks, R. (١٩٩٧). Descriptive epidemiology of acne vulgaris in the community. Australia's. J. Dermatol. ٣٨ (٣): ١١٥ – ١٢٣.

Swale, V.; Sasient, P. and Macgregor, A. (١٩٩٨). Heritability of common skin diseases using the twin model. A UK twin study. Br. J. Dermatol. **١٣٩**: ١٥ – ١٦.

Sykes, R.B. and Mattew, M. (١٩٧٦). The β-lactamases of Gram negative bacteria and their role in resistance of β-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Agents Chemother. ٢: ١١٥ – ١٥٧.

Taylor, G.A. and Shalita, A.R. (٢٠٠٤). Benzoyl peroxide-based combination therapies for acne vulgaris. Am. J. Clinic. Dermatol. **٥ (٤)**: ٢٦١ – ٢٦٥.

Tennent, J.M.; Lyon, B.R.; Gillespie, M.T.; May, J.W. and Skurray, R.A. (١٩٨٥). Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid – mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **٢٧ (١)**: ٧٩ – ٨٣.

Thiboutot, D.M. (١٩٩٧). Acne: An overview of clinical research findings. Dermatol. Clin. **١٥**: ٩٧ – ١٠٩.

Thiboutot, D.M. (٢٠٠٠). New treatments and therapeutic strategies for

acne. Arch. Fam. Med. **٩ (٢)**: ١٧٩ – ١٨٧.

Thiboutot, D.M. (٢٠٠١). Endocrinological evaluation and hormonal therapy for women with difficult acne. JEADV. **١٥ (٣)**: ٥٧ – ٦١.

Thiboutot, D.M.; Bayne, E. and Cunliffe, W.J. (٢٠٠٠). Immunolocalization of ٥-α-reductase isozymes in acne lesions and normal skin. Arch. Derm. **١٣٦**: ١١٢٥ – ١١٢٩.

Trevors, J.T. (١٩٨٦). Plasmid curing in bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. **٣٢**: ١٤٩ – ١٥٧.

Tunney, M.M.; Patrick, S.; Curran, M.D.; Ramage, G.; Hanna, D.; Nixon, J.R.; Gorman, S.P.; Davis, R.I. and Anderson, N. (١٩٩٩). Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunfluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial ١٦S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. **٣٧**: ٣٢٨١ – ٣٢٩٠.

Tunney, M.M.; Ramage, G.; Patrick, S.; Nixon, J. R.; Murphy, P.G. and Gorman, S.P. (١٩٩٨). Improved antibiotic therapy for elimination and prevention of prosthetic hip infection. J. Pharm. Pharmacol. **٥٠**: ٤٠ – ٤٥.

Voss, J.G. (١٩٧٠). Differentiation of two groups *Corynebacterium acnes*. J. Bacteriol. **١٠١ (٢)**: ٣٩٢ – ٣٩٧.

Vuong, C.; Gotz, F. and Otto, M. (٢٠٠٠). Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **٦٨ (٣)**: ١٠٤٨ – ١٠٥٣.

Wayne, C.M.; Dowell, V.R.; Lewis, V.J. and Schekter, M.A. (١٩٦٧). Cultural characteristics and fatty acid composition of Co acnes. J. Bacteriol. **٩٤ (٥)**: ١٣٠٠ – ١٣٠٥.

Webster, G.F. (٢٠٠٢). Acne vulgaris. BMJ. **٣٢٥**: ٤٧٥ – ٤٧٩.

Webster, G.F.; Leyden, J.J.; Musson, R.A. and Douglas, S.D. (١٩٨٥). Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to killing and degradation by human neutrophils and monocytes in *vitro*. Infect. Immun. **٤٩ (١)**: ١١٦ – ١٢١.

Webster, G.M. (١٩٩٥). Inflammation in acne vulgaris. J. Am. Acad. Derm. **٣٣**: ٢٤٧ – ٢٥٣.

Wiedemann, B. and Tolxdorff – Neutzling, R.M. (١٩٨٥). Mechanism of resistnce to Beta – lactam antibiotics. Chemoth. **٤**: ٢٤ – ٧.

Wiedemann, B.; Kliebe, C. and Kreken, M. (١٩٨٩). The Epidemiology of β – lactamases. Antimicrob. Chemoth. **٢٦**: ٥٩٧ – ٦٠٤.

Williams, M.; Cunliffe, W.J. and Gould, D. (١٩٧٤). Effect of hydration on pilosebaceous duct orifice. Br. J. Dermatol. **٩٠**: ٦٣١ – ٥.

Yee, K.C. and Cunliffe, W.J. (١٩٩٤). Itching in Acne – unusual complication of therapy. Dermatol. **١٨٩**: ١١٧ – ١١٩.

Yeung, C.K.; Teo, L.H.Y.; Xiang, L.H. and Chan, H.H.L. (٢٠٠٢). A Community – based epidemiological study of acne vulgaris in Hong Kong adolescents. Acta. Dermato – Venereol. **٨٢ (٢)**: ١٠٤ – ١١٤.

Zaenglein, A.L. and Thiboutot, D.M. (٢٠٠٣). Acne vulgaris In: Bolognia JL. Jorizzo JL.Rapini RP., (eds.). Dermatol. New York: Mosby. ٥٣٣ _ ٥٣٤.

## ملحق ١
## قطر منطقة التثبيط القياسية لأقراص المضادات الحيوية المستعملة
## ( NCCLS, ١٩٩٠ )

| ت | المضاد الحيوي | الرمز | التركيز (مايكروغرام/قرص) | قطر منطقة التثبيط | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | المقاومة ( مليميتر أو أقل ) | متوسطة الحساسية | الحساسة ( مليميتر أو أكثر ) |
| ١ | بنسلين – ج | P | *١٠ | ٢٨ | - | ٢٩ |
| ٢ | أموكسلين | Amx | ٢٥ | ٢٢ | ٢٣ – ٣٠ | ٣١ |
| ٣ | أمبسلين | Amp | ١٠ | ٢٨ | - | ٢٩ |
| ٤ | دوكسي سايكلين | DO | ٣٠ | ١٤ | ١٥ – ١٦ | ١٩ |
| ٥ | لنكومايسين | L | ٢ | ٩ | ١٠ – ١٤ | ١٥ |
| ٦ | سيفالكسين | CL | ٣٠ | ١٤ | ١٥ – ١٧ | ١٨ |
| ٧ | سبروفلوكساسين | Cip | ٥ | ١٥ | ١٦ – ٢٠ | ٢١ |
| ٨ | ارثرومايسين | E | ١٥ | ١٣ | ١٤ – ١٧ | ١٨ |
| ٩ | كلورامفنكول | C | ٣٠ | ١٢ | ١٥ – ١٧ | ١٨ |
| ١٠ | نيومايسين | N | ٣٠ | ١٢ | ١٣ – ١٦ | ١٧ |
| ١١ | تراي مثبرم | SXT | ١.٢٥ + ٢٣.٧٥ | ١٠ | ١١ – ١٥ | ١٦ |
| ١٢ | تتراسيكلين | TE | ٣٠ | ١٤ | ١٥ – ١٨ | ١٩ |
| ١٣ | سيفوتاكسم | CTX | ٣٠ | ١٨ | ٢١ – ١٩ | ٢٢ |
| ١٤ | جنتامايسين | CN | ١٠ | ١٢ | ١٤ – ١٣ | ١٥ |
| ١٥ | كلندامايسين | DA | ٢ | ١٤ | ٢٠ – ١٥ | ٢١ |
| ١٦ | أميكاسين | AK | ٣٠ | ١٤ | ١٥ – ١٦ | ١٧ |
| ١٧ | ريفامبسين | Rif | ٥ | ١٦ | ١٧ – ١٩ | ٢٠ |

* وحدة دولية ( IU – International Unit ) .

# الاســـــتنتاجات والتوصـــــيات Conclusions and Recommendations

## أولاً : الاستنتاجات

١. البكتريا السائدة في عينات الفدام ( Comedone ) هي *P. acnes* ، بينما البكتريا السائدة في عينات البثور ( Pustule ) هي *S. epidermidis* .
٢. أظهرت معظم العزلات للأنواع البكتيرية الثلاثة *P. acnes* و *S. epidermidis* و *S. aureus* مقاومة عالية لمجموعة مضادات البيتالاكتام ( بنسلين – ج ، والامبيسلين والاموكسيلين والامبيكلوكس ) .
٣. امتازت معظم العزلات للأنواع البكتيرية الثلاثة المذكورة آنفاً بقدرتها على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز ، وهذا يفسر مقاومتها العالية لمضادات مجموعة البيتالاكتام .
٤. إن الجينات الوراثية المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية المتضمنة بنسلين – ج والامبيسلين والامبيكلوكس والاموكسيلين كانت بلازميدية الموقع .
٥. قابلية البلازميدات المستخلصة من بكتريا *S. epidermidis* و *S. aureus* على التعبير المظهري في بكتريا *E. coli* MM٢٩٤ ، مما يشير إلى قابلية بلازميدات العزلات قيد الدراسة على التعبير في أكثر من مضيف .

## ثانياً : التوصيات

١. دراسة عوامل الضراوة للأنواع البكتيرية *P. acnes* و *S. epidermidis* ودورها في إحداث الإصابة بصورة أوسع .
٢. دراسة آلية المقاومة للأنواع البكتيرية المسببة لحب الشباب تجاه المضادات الحيوية على المستوى الجزيئي ولاسيما إنزيمات البيتالاكتام واسعة الطيف ESBLs .
٣. إجراء دراسات وراثية على بكتريا *P. acnes* ولاسيما تجربتي التحول والتحييد وعلاقتهما بالمقاومة للمضادات الحيوية .