The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul / College of Science
Department of Biology

Phenotypic and Molecular Characterization of *Cutibacteruim acnes* Isolated from Acne Vulgaris in Mosul City

Salim Ahmed Mahmood Mohammad Salih Alkardoshi

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised by

Assistant professor

Dr. Ghada Abdul-Razzaq Mohammad Al-Taee

1446 A.H. **2024 A.D.**

Abstract

125 samples were collected from patients with acne vulgaris cases in Mosul city, from schools and dermatology consultations at Al- Salam Teaching Hospital, and Mosul General Hospital. Samples were taken using a sterile swab from pus in side acne then transferred the samples into sterile thioglycolate broth and incubation period was for 5-7 days in 37º C, after that the culture were transferred to Brucella agar supplemented with vitamin k and sheep blood placed in anaerobic incubation using jar contain gas pack, the incubation period was for 3-5 days in 37º C. The identification of bacteria achieved by phenotype diagnosis (macroscopic and microscopic), and molecularly by detection of universal 16s rRNA gene. Seven strains of *Cutibacterium acnes* and one strains of *Cutibacterium avidum* were obtained with (5.6%) and (0.8%) respectively, from all samples.

Antibiotic susceptibility test was performed against eight antibiotics (Clindamycin, Vancomycin, Tetracycline, Imepinem, Gentamycin, Levofloxacin, Fusidic acid and Azithromycin) by disc diffusion assay. Results showed that the seven strains of *C. acnes* are resist to fusidic acid and azithromycin with 85.7% for both and this was the highest resistant percentage, while for tetracycline the resistant percentage was 71.4, clindamycin and gentamycin were having the same resistance percentage 57.1 and vancomycin 42.8%. Lastly the isolates were sensitive 100% to imipenem and levofloxacin100% sensitive to imipenem and levofloxacin.

In this study, an evolutionary tree was created depending on the similarity degree of neighbor – for our isolation based on the MEGA11 program. The resemblance was ranging from 74 to 99 %.

The inhibitory effect of some plant extract (curcumin, Peels banana and Myrrah) and essential oils (tea tree oil and peppermint oil) was investigated against *C. acnes* and the results that showed: the tea tree oil with a concentration of 100% was affected on three strains, the peppermint oil with a concentration of (100 and 75%) had affected on four strains, and the sensitivity percentage of myrrh ethanolic extract was reached 71% with the concentration of both 100% and 75%.

The synergism achieves by interaction between resist antibiotics with essential oils and natural materials that added separately. The result showed no synergism relationship between these components.

The biotypes (depending on sugar fermentation), and genotypes (depending on particular genes) for seven strains of *C. acnes* were detected and the results were: four biotypes were obtained depending on the fermentation of sugars (Ribose, Erythrotol and Sorbitol), one strain was within the first biotype, two strains were within the third biotype, one strain was within the fourth biotype and three strains were within the fifth biotype. Two genotypes were obtained depending on the presence or absence of six genes which are: 16s rRNA, *ATPase*, *atpD*, *Toxic fic family*, *recA*, and *soda*. The first genotype belongs to IA_2 included one strain only, and the second genotype is a new pattern which has appeared for six strains and did not mentioned in previous, it contains all the previously mentioned genes except *Toxin Fic family* gene. Therefore, it is possible to suggest a new pattern to be added to the six discovered patterns and name it IV.

The genome sequence of *Cutibacterium acnes* SAGH17 has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number JBEFLC000000000

Whole genome sequence was done and the genome features were: total length of genome was (2,468,425) bp with GC content 60.1 % and total at protein- coding sequences were ٢٤١٩ and the number of RNA gens were 48.

Phylogenetic tree following analysis of ١٢ nucleotide sequences were drawn based on balanced minimum evolution method, *Cutibacterium acnes SAGH17* strain was a part of a phylogenetic tree was clustered with other closely related srain of *Cutibacterium* strains. According to genome features, strains in the phylogenetic tree based on their homology was arranging as following: *Cutibacterium acnes* DSM 1897, *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, *Cutibacterium acnes subsp. Defendens* ATCC 11828, *Cutibacterium acnes subsp. elongatum JCM* 18919, *Cutibacterium namnetense* CCUG 66358, *Cutibacterium modestum* JCM 33380T, *Cutibacterium porci* DSM 101006, *Cutibacterium avidum* ATCC25577 and *Cutibacterium equinum* CBA3108T, *Cutibacterium granulosum* DSM 20700 strain was distant about other *Cutibacterium* and clustered with *Acidipropionibacterium timonense* Marseille-P4482 which were used to create a root for the genetic tree of the strains.

based on *is*DDH, GC content, δ- value, Genome size and Number of proteins 11 closely associated type strains to SAGH17 strain has designed and compared with the SAGH17 where *Cutibacterium acnes ATCC 6919* strain was the most closely related and *Acidipropionibacterium timonense Marseille-P4482* strain was the most distant.

الخلاصة:

Cutibacterium acnes هي من اهم البكتريا المسببة لحب الشباب، وهي من ميكروبات المتعايشة في الجلد والتي تنمو غالبًا في المناطق الغنية بالغدد الدهنية. وقد تم اعتبارها تقليديًا بكتيريا متعايشة.

تم جمع ١٢٥ عينة من مرضى حالات حب الشباب الشائع في مدينة الموصل، من استشاريات الأمراض الجلدية في مستشفى السلام التعليمي ومستشفى الموصل العام، وتم تحديد البكتيريا من خلال التشخيص الروتيني (المظهري والمجهري)، والتشخيص الجزيئي على أساس Universal 16s rRNA gene. تم الحصول على سبع سلالات من *Cutibacterium acnes* وسلالة واحدة من *Cutibacterium avidum* بنسبة (٥,٦٪) و (٠,٨٪) على التوالي من جميع العينات.

تم اختيار ثمانية مضادات حيوية: Clindamycin، Vancomycin، Tetracycline ، Gentamycin، Imepinem، Levofloxacin، Fusidic acid وAzithromycin

لإجراء اختبارات الحساسية بالاعتماد على طريقة الأقراص المنتشرة، وأظهرت الدراسة أن السلالات السبع من *C. acnes* كانت حساسة بنسبة ١٠٠٪ ضد Imepinem وLevofloxacin.

في هذه الدراسة، تم إنشاء شجرة تطورية تعتمد على درجة التقارب بين هذه العزلات المشخصة جزيئيًا بناءً على برنامج MEGA11 وتراوح التقارب من ٧٤ إلى ٩٩٪.

تم دراسة التأثير المثبط لبعض الزيوت الطبيعية (زيت شجرة الشاي وزيت النعناع) والمواد الطبيعية (الكركمين وقشور الموز والمرة) ضد *C. acnes* حيث اظهرت النتائج: ان زيت شجرة الشاي بتركيز ١٠٠٪ كان له التأثير على ثلاث سلالات وزيت النعناع بتركيز (١٠٠ و٧٥٪) كان له التأثير على أربع سلالات وبلغت نسبة حساسية مستخلص المرة ٧١٪ بتركيز: ١٠٠٪ و٧٥%.

تم الكشف عن التنميط الحيوي (اعتمادا على تخمر السكريات) والتنميط الجيني (اعتمادا على جينات معينة) لسبع سلالات من *C. acnes* وكانت النتائج: تم الحصول على اربعة أنماط حيوية اعتمادا على تخمر السكريات (Ribose, Erythrotol and Sorbitol) حيث كانت سلالة واحدة

ضمن النمط الحيوي الاول وسلالتان ضمن النمط الحيوي الثالث وسلالة واحدة ضمن النمط الحيوي الرابع وثلاث سلالات ضمن النمط الحيوي الخامس. تم الحصول على نمطين جينيين اعتمادا على وجود أو غياب ست جينات وهي:(*16s rRNA, ATPase, atpD, Toxic fic family, recA,* and *sodA*) النمط الجيني الأول ينتمي إلى IA^2 متضمنا سلالة واحدة فقط، والنمط الجيني الثاني هو نمط جديد ظهر لستة سلالات ولم يذكر في البحوث السابقة، حيث يحتوي على جميع الجينات المذكورة سابقا باستثناء جين *Toxic fic family* وبالتالي من الممكن اقتراح نمط جديد يضاف إلى الأنماط الستة المكتشفة ويسمىIV .

تم إجراء تسلسل الجينوم الكامل وكانت سمات الجينوم: الطول الكلي للجينوم (٢,٤٦٨,٤٢٥) زوج من القواعد النيتروجينية مع محتوى GC بنسبة ٦٠,١٪ وإجمالي تسلسلات ترميز البروتين كانت ٢٤١٩ وعدد جينات RNA كانت ٤٨.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

١٤٤٦ هـ
٢٠٢٤ م

التوصيف المظهري والجزيئي لبكتريا *Cutibacterium acnes* المعزولة من حالات حب الشباب في مدينة الموصل

سالم احمد محمود محمد صالح الكردوشي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة

غادة عبد الرزاق محمد الطائي

١٤٤٦ هـ ٢٠٢٤ م