



DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE *Cutibacterium acnes* A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

ESTUDIANTES PAOLA ANDREA SANCHEZ DIAZ

LEIDY KATHERINE SEPULVEDA CUBILLOS

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA  
TRABAJO DE GRADO Bogotá D.C  
Mayo 2018



DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE *Cutibacterium acnes* A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

ESTUDIANTES PAOLA ANDREA SANCHEZ DIAZ

LEIDY KATHERINE SEPULVEDA CUBILLOS

ASESORES LUCIA CONSTANZA CORRALES SANDRA  
CONSUELO HENAO RIVEROS

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA  
TRABAJO DE GRADO BOGOTA D.C  
Mayo 2018

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedicamos en primer lugar a Dios por habernos acompañado a lo largo del camino y permitirnos alcanzar una de las metas propuestas para nuestro crecimiento académico y personal, a nuestros padres y familia por darnos su apoyo incondicional; con sus consejos y palabras de aliento fueron el motor para poder culminar. En especial a nuestras asesoras, quienes, con su apoyo, paciencia y su entrega a la docencia nos guiaron por el sendero adecuado, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y Docentes que nos acompañaron en los años de formación profesional y por último a nuestros grandes amigos, por recorrer el camino junto a nosotras día a día y estar prestos a cualquier situación, para ayudarnos y motivarnos cuando estábamos cansadas.

Con cariño,

*Paola Sánchez y Katherine Sepúlveda.*

## AGRADECIMIENTOS

Expresamos un agradecimiento muy especial a la Dra. Lucía Corrales Ramírez y a la Dra. Sandra Henao Riveros, quienes no solo nos brindaron su apoyo, sino que compartieron su conocimiento ampliamente y de forma desinteresada, contribuyendo en nuestra formación.

Al departamento de microbiología de la Universidad Nacional por abrirnos las puertas y permitirnos llevar a cabo el desarrollo de la investigación.

Al personal del laboratorio central de microbiología de la Universidad Nacional, por su disponibilidad para colaborarnos siempre que solicitamos su ayuda.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	14
1. ANTECEDENTES .....	16
2. OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo General .....	23
2.2 Objetivos Específicos .....	23
3. MARCO REFERENCIAL .....	24
3.1 <i>Cutibacterium acnes</i> ( <i>C. acnes</i> ) .....	24
3.1.1 Condiciones para el aislamiento.....	25
3.1.2 Metabolismo .....	26
3.1.3 Factores de virulencia .....	27
3.1.3.1 Biofilm .....	27
3.1.3.2 Inducción a inflamación. ....	28
3.1.4 Identificación .....	29
3.2 El acné. ....	29
3.2.1 Patogénesis del acné. ....	31
3.3 Aislamiento microorganismos anaerobios .....	33
3.3.1 Medios de cultivo que favorecen el aislamiento de <i>C. acnes</i> . ....	33
4. DISEÑO METODOLOGICO .....	37
4.1 Tipo de estudio.....	38
4.1.1. Universo .....	38
4.1.2. Muestra .....	38
4.2. Criterios de inclusión: .....	38
4.1.1 Criterios de exclusión: .....	38
4.3 Población. ....	38
4.4. Hipótesis .....	38
4.5. Variables.....	39

4.6. Indicadores .....	39
5. PROCEDIMIENTOS.....	40
5.1 Revisión de la literatura .....	40
5.1.1 Componentes seleccionados para cada uno de los medios de cultivos propuestos. ...	40
5.2 Fase 1. Recuperación de la cepa <i>C. acnes</i> ATCC 11827 en el Medio Wilkins Chalgren.	41
5.3 .Fase 2. Ensayo de eficiencia de los tres medios de cultivo propuestos con la cepa <i>C. acnes</i> ATCC 11827. ....	41
5.4 Fase 3. Aislamiento e Identificación de <i>C. acnes</i> a partir de muestras clínicas. ....	42
5.4.1 Procedimiento para la toma de muestra de Comedones de piel. ....	43
5.4.2 Cultivo de muestras de comedones de piel .....	43
6. RESULTADOS .....	44
6.1 Revisión Bibliográfica .....	44
6.2 Fase1. Recuperación de la cepa <i>C. acnes</i> ATCC 11827 en el Medio Wilkins Chalgren. .	44
6.3 Fase 2. Ensayo de Eficiencia de medios propuestos con la Cepa ATTC 11827 de <i>C. acnes</i> . ....	46
6.3.1 Coloración de Gram <i>Cutibacterium acnes</i> en los medios de cultivo propuestos. ....	49
6.4 Fase 3. Aislamiento e Identificación de <i>C. acnes</i> a partir de comedones de la piel de la cara (muestras clínicas), en el Medio Seleccionado (Medio No. 1). ....	51
6.4.1 Identificación de <i>Cutibacterium acnes</i> en muestras clínicas. ....	52
7. DISCUSIÓN .....	54
8. CONCLUSIONES .....	59
ANEXOS .....	60

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biotipificación de <i>C. acnes</i> (basado en el test de fermentación de azúcares) .....	26
Tabla 2. Serotipos de <i>C. acnes</i> (basado en la detección de galactosa en la pared) .....	26
Tabla 3. Composición de los tres medios .....	41
Tabla 4 . Identificación de <i>C. acnes</i> cepa ATCC 11827 por técnica cromogénica y de fluorescencia. .....	47
Tabla 5 Crecimiento de <i>C. acnes</i> ATCC 11827 en el medio de cultivo No. 1 .....	48
Tabla 6. Crecimiento de <i>C. acnes</i> ATTC 11827 en el medio de cultivo No.2 .....	49
Tabla 7. Crecimiento de <i>C. acnes</i> ATCC 11827 en el medio de cultivo No. 3 .....	50
Tabla 8. Resultados del crecimiento en el medio No .1, de muestras de comedones de la piel de la cara de pacientes voluntarios .....	53
Tabla 9. Identificación de <i>C. acnes</i> en muestras clínicas de pacientes voluntarios por pruebas bioquímicas con el sistema BBL Crystal Anaerobe ID System .....	55
Tabla 1 0. Recuperación de <i>C. acnes</i> , a partir de las muestras de pacientes, inoculadas en placa y caldo tioglicolato. ....	55

## INDICE DE CUADROS

Cuadro1. Manifestaciones clínicas del acné. ....	31
Cuadro 2. Evolución patología de acné.....	32
Cuadro 3. Infecciones que asocian a <i>C. acnes</i> como agente oportunista. ....	33
Cuadro 4. Medios de cultivo utilizados en para el aislamiento de <i>C.acnes</i> .....	36

## INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Pasos de la alteración folicular .....	33
Imagen 2. Panel de identificación BBL CRYSTAL Anaerobe ID System.....	47
Imagen 3. Crecimiento de <i>C. acnes</i> en el medio de cultivo No.1.....	48
Imagen 4. Crecimiento de <i>C. acnes</i> en el medio de cultivo No.2.....	49
Imagen 5. Crecimiento de <i>C. acnes</i> en el medio de cultivo No.3.....	50
Imagen 6. Cultivos de muestras de comedón de pacientes en el medio de cultivo No 1 .....	54

## INDICE DE GRAFICOS

Grafica 1. Crecimiento (UFC) de cepa *C. acnes* ATCC 11827 en los medios propuestos

durante los días de incubación..... 52

## INDICE DE FIGURAS

Figura1. Diseño metodológico. ....	38
Figura 2. Ensayo de eficiencia de los tres medios de cultivo propuestos con la cepa <i>C. acnes</i> ATCC 11827.....	43
Figura 3. Crecimiento de <i>C. acnes</i> ATCC 11827 en agar Wilkins Chalgren.....	46
Figura 4. Coloración de Gram de los diferentes cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 11827en los medios 1, 2 y 3.....	51

## RESUMEN

Existe una problemática a nivel de salud pública relacionada con el incremento de patologías causadas por microorganismo anaerobios como el *C. acnes*, entre ellas el acné e infecciones en tejidos blandos, el acné es una de las principales causas de consulta en dermatología. Como muchos microorganismos anaerobios necesita requerimientos nutricionales complejos, largo tiempo para su crecimiento lo que dificulta realizarle pruebas de sensibilidad y resistencia a antibióticos, conllevando a la necesidad de proponer medios de cultivo eficientes para su aislamiento a partir de muestras de comedones en piel y otras. El presente estudio busca determinar la eficiencia de tres medios de cultivo propuestos para el aislamiento microbiológico de *Cutibacterium acnes* provenientes de muestras biológicas.

La metodología incluyó, revisión de la literatura sobre requerimientos nutricionales del *C. acnes*, propuesta de los nutrientes y sustratos que deben contener los medios, diseño de tres medios para evaluación de productividad, ensayo de productividad con cepa ATCC y finalmente ensayo de recuperación y productividad del microorganismo a partir de muestras biológicas. El ensayo mostró mejor resultado con el medio No1, que contenía glicerol como único sustrato adicional, que de acuerdo con el metabolismo del *C. acnes* le permite utilizarlo en la formación de su pared celular, generando una mayor producción de biomasa en el medio y acortando el tiempo de incubación de 14 a 5 días. Este medio puede ser una herramienta útil para ayudar en el diagnóstico y el tratamiento de infecciones por *C. acnes*, así como se minimizaría el reporte de cultivos negativos antes de 5 días de incubación. **Palabras clave:** *Cutibacterium acnes*, medios de cultivo, unidad pilosebácea, acné, glicerol.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias anaerobias son microorganismo de difícil aislamiento debido a sus exigencias nutricionales y de anaerobiosis; algunos de sus requerimientos son: vitamina k (menadiona), hemina (factor x), extracto de levadura, sangre, peptona, entre otros. Se caracterizan por tener un crecimiento lento, Los medios descritos en la literatura para su cultivo son: el agar glicerol al 4%, agar tripticasa soya con extracto de levadura, agar Brucella con 5 % sangre de caballo, agar infusión cerebro-corazón, agar sangre suplementado, agar chocolate, agar anaerobio, agar wilkins chalgren, agar schaedler. [1-3]. En el proceso de aislamiento e identificación de bacterias anaerobias es importante considerar aspectos como: la toma y transporte de la muestra, el tiempo que transcurre entre la toma de la muestra y el cultivo, los medios de cultivo adecuados para cada uno de los géneros bacterianos, los tiempos, temperaturas y atmósferas de incubación [2].

*Cutibacterium acnes* es una bacteria anaerobia; Gram-positivo, inmóvil. Hace parte de la microbiota de la piel; está implicado en la fisiopatología del acné, principalmente por la colonización de los folículos y desencadenamiento de una respuesta inflamatoria no controlada. Actualmente se le ha asociado también como un agente oportunista en infecciones clínicas como: infecciones de articulación protésica [4], infecciones en lesiones bucales, síndrome SAPHO (sinovitis, acné, postulitis, hiperostosis, osteítis) y en la colonización de implantes como lentes intraoculares, válvulas cardíacas y catéteres; de igual manera, se ha evidenciado un aumento de resistencia frente a los antimicrobianos. [5,6]

El cultivo microbiológico de *C. acnes* no está muy detallado en la literatura, Kishishita y et al, mencionan en su trabajo de investigación que el aislamiento de *C. acnes* se ve afectado por el pH, medio de transporte, sustancias para su preservación, tiempos y temperaturas de incubación.

Se recomienda considerar la incubación al menos durante 14 días para detectar los cultivos verdaderos positivos y verdaderos negativos [7].

La identificación óptima de microorganismos anaerobios implicados en procesos infecciosos es importante para el manejo clínico y la elección de una adecuada terapia. La elección del medio de cultivo correcto es clave para poder recuperar la bacteria, existen varios medios de cultivo comerciales que regularmente son de alto costo. Por esta razón, el objetivo de este estudio es determinar la eficiencia de tres medios de cultivo propuestos para el aislamiento microbiológico de *Cutibacterium acnes* provenientes de muestras biológicas para optimizar el aislamiento y posterior identificación de *Cutibacterium acnes*

## 1. ANTECEDENTES

En 1973, en Alemania, en la Universidad de Coligen, G. pulverer, et al [8], realizaron estudios de la capacidad fermentativa y serológicos con *Cutibacterium acnes*, como características de diferenciación del microorganismo, para el estudio fueron analizadas 72 cepas de *C. acnes* que se compararon con 5 cepas ATCC; pudieron definirse ocho biotipos sobre la base de las reacciones de fermentación, los azúcares utilizados para la subdivisión de la especie fueron maltosa, manitol y sorbitol y se determinaron 11 serotipos mediante los antígenos por medio de pruebas de aglutinación. Para el análisis se produjeron antisueros de conejo que aglutinaban las cepas de *P. acnes*. con los cinco antisueros absorbidos 95, c 51, d 34, s 140.

En 1976 en EE. UU se realizó la descripción de un medio para uso en pruebas de susceptibilidad a antibióticos en bacterias anaerobias, el cual fue presentado en la sociedad americana de microbiología por Tracy Wilkins y Sarah Chalgren [2]; en el estudio se describe un medio para observar la actividad inhibitoria de los antibióticos en microorganismos anaerobios por la técnica de dilución en agar. Este estudio respondió a la necesidad de adecuar un medio específico para estos microorganismos dado que el medio Mueller-Hinton, no permitía el crecimiento de la mayoría de especies de bacterias anaerobias.

Por otro lado, el medio agar brucella con 5% de sangre que también se utilizaba para este fin, presentaba variaciones ya que mostraba cambios con el tiempo y se contaminaba fácilmente; razón por la cual los investigadores proponen este nuevo medio denominado posteriormente Wilkins y Chalgren, compuesto por tripticasa (1%), gelatina (1%), extracto de levadura (0.5%), glucosa

(0.1%), piruvato (0,1%), arginina (0,1%), NaCl (0,5%), hemina (5 gr / ml), vitamina k 1ug / ml), agar (1,5%) y que no requiere la adición de sangre para mantener el crecimiento de la mayoría de los aislados clínicos de bacterias anaerobias.

En 1979 en Japón A. Kishishita, T. Ushijima, et al [9], realizaron una investigación en la que establecieron la biotificación de *Cutibacterium acnes* aislado de la piel, el estudio fue presentado en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Kyoto, este estudio tuvo como objetivo describir las propiedades bioquímicas y serológicas características de *P. acnes*, para el estudio utilizaron 128 cepas de *Cutibacterium acnes* que fueron aisladas de la piel facial de voluntarios que luego se compararon con cepas estándar, ATCC; las cepas que fueron aisladas de *C. acnes* se clasificaron en cinco biotipos (B1 a B5) según la prueba de fermentación, para esta clasificación se utilizaron azúcares como la ribosa, eritritol y sorbitol. Para la determinación de los serotipos a partir de una prueba de aglutinación se estableció que *C. acnes* perteneciente al serotipo I tenía galactosa como azúcar de la pared celular, pero que el serotipo II no la poseía.

En el estudio realizado por Kishishita M, Ushijima T, et al [10], en Japón en el año 1980, se propone un nuevo medio de cultivo para el aislamiento de *Propionibacterias*, con el fin de precisar el aislamiento y analizar las condiciones adecuadas para las pruebas bioquímicas utilizadas en la clasificación de éstas. Con el fin de evaluar los efectos de los diluyentes sobre la preservación de las bacterias, se inocularon  $10^3$  UFC en los diluyentes a saber (tampón fosfato 1 ml suplementado con Triton X-100 al 0,1%, y tampón fosfato 1 ml suplementado con Tween 80 al 0,1%), las suspensiones se incubaron a 25 y 37°C, después de 1-2-4 y 17 h se inoculó 0,1 ml de la suspensión en dos placas de agar compuestas por: tripticasa 1.5% (BBL Microbiology Systems), extracto de levadura 0.5% ( BBL), extracto de corazón 0.5% (Nissui), glucosa 0.3%, NaCl 0.2%,  $K_2HPO_4$  0.2%, L-cisteína HCl 0.03%, agar 1.5%, Tween 80, pH (6,8). La viabilidad se determinó con el conteo de UFC después de 4 días de incubación a 37° C en anaerobiosis (CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>, 10%:90%).

Ensayos de inhibición: se inocularon cinco cepas de *Propionibacterias* en tubos con el medio de ensayo (composición similar a la descrita anteriormente, excepto que la concentración de agar se redujo a 0.1%) y contenían diferentes concentraciones de Triton X-100 o Tween 80, el crecimiento de *Propionibacterias* se determinó por espectrofotometría a 600 nm.

Para el aislamiento de *Propionibacterias* de la piel humana, se limpió con hisopo estéril la zona de muestreo (frente de los voluntarios), posteriormente el hisopo se colocó en un tubo que contenía 10 ml del diluyente (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4%, Tween 80 0.1%, L-cisteína HCL 0.03 %, pH 6.8), se hicieron diluciones para poder contar el número de bacterias; de cada dilución se inocularon 0.1 ml en placas de agar (tripicasa 1.5 %, extracto de levadura 0.5%, extracto de corazón 0.5%, glicerol 1.0%, NaCl 0.2%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2%, L-cisteína HCl 0.03%, oleinato de sodio 0.005%, purpura de bromocresol 0.002 %, agar 1.5 %, pH 6.8) se incubaron en anaerobiosis por 7 días, y el resto de las suspensiones se mantuvieron en un baño de hielo durante todo el proceso de incubación.

La clasificación de las bacterias se realizó mediante pruebas bioquímicas: catalasa, hidrólisis de esculina, indol, nitratos, digestión de la leche, fermentación de azúcares. La serotipificación se hizo por aglutinación. Se observaron colonias con diferente morfología (amarillo, ligeramente amarillo y pardusco) en una cantidad aproximada de 20 a 100 UFC por placa.

El Triton X-100 añadido al diluyente inhibe el crecimiento de *Propionibacterias* en concentraciones de 0,005-0,1%, por el contrario, el diluyente que contenía Tween 80 optimizó el crecimiento bacteriano. En cuanto el nuevo medio se compararon las colonias de *Cutibacterium acnes*, *Cutibacterium granulosum* y *Staphylococcus epidermidis*.

Estas mostraron diferencias morfológicas significativas, por tanto, se concluye que el medio es útil ya que proporciona todos los nutrientes necesarios para el desarrollo adecuado y permitiendo una

diferenciación de estos microorganismos. Entre 447 cepas de *C. acnes* y 86 cepas de *P. granulosum* aisladas de los voluntarios, todas las cepas de *C. acnes* fueron positivas para indol, nitrato, leche e hidrólisis de gelatina, mientras que todas las cepas de *P. granulosum* fueron negativas para todos los ensayos, demostrando que estas pruebas son claves en la clasificación de *Propionibacterias*.

En 1990 en California, Brazier J, Goldstein E, et al [3], realizaron un estudio sobre la comparación del agar de anaerobios exigentes con el agar de Wilkins-Chalgren, agar infusión de cerebro corazón y agar brucella para pruebas de susceptibilidad [10], con el fin de comparar la funcionalidad de los medios de cultivo y así determinar el rendimiento de cada uno de los agares. En el estudio se manejaron diferentes microorganismos para la evaluación entre ellas, cepas de *Fusobacterium*; el agar anaerobio exigentes tuvo mayor rendimiento en el aislamiento de microorganismos anaerobios, seguido del agar infusión cerebro corazón, agar brucella y por último el agar Wilkins Chalgren, posteriormente los medios fueron suplementados con sangre de cordero entera la cual mejoró el rendimiento de todos los medios.

En 2002 en Chicago, Roe D, Finegold S, Citron D, et al., realizaron un estudio de comparación de las características de crecimiento de anaerobios [11], usando 5 medios de agar diferentes, partiendo de un estudio multidisciplinario compararon el crecimiento de treinta microorganismos anaerobios, utilizando 5 medios de agar diferentes como : agar WilkinsChalgren con tres variaciones, sin suplementar, suplementado con sangre de dos clases de oveja, y agar Brucella con dos variaciones ,suplementado con vitamina K1, hemina y la sangre de las ovejas; los medios se compararon a partir de la calidad y la cantidad de crecimiento de los microorganismos, los análisis se realizaron enteramente en cámara anaeróbica y una incubación anaeróbica.

Según las comparaciones del estudio los medios muestran una mayor eficiencia cuando son suplementados con sangre, que cuando están en su forma básica, sin ningún tipo de aditivo o suplemento.

Mendoza N, Paul O, et al [12]. Realizaron un estudio en Colombia entre junio 2005 y mayo 2006, en el cual determinaron la susceptibilidad antimicrobiana de *C. acnes* los antibióticos de uso común en el tratamiento del acné (eritromicina, clindamicina, tetraciclina, doxiciclina y minociclina). La población de estudio incluía pacientes con diagnóstico clínico de acné que asistían a dos clínicas de Bogotá, el tamaño de la muestra fue de 100 pacientes, los datos recogidos para la inclusión al estudio fueron; datos demográficos (edad, sexo, grado de educación, nivel socioeconómico), información de tratamientos previos (incluyendo el último tratamiento) y duración.

Se recolectaron las muestras de lesiones del acné, pápulas y pústulas, utilizando hisopos estériles humedecidos en solución salina al 0,9%, el hisopo se inoculó inmediatamente en el medio de transporte (Viability Medium Gothenburg III: VMGA III), las muestras se procesaron dentro de las 24 horas de la colección; se inocularon en placas de agar brucella con sangre, suplementado con hemina y menodiona-vitamina K3, y se incubaron durante siete días en atmósfera anaeróbica.

Las colonias se seleccionaron en base a la morfología característica de *C. acnes* (color blanco-gris, con un diámetro de 0,05mm), en la tinción de Gram se observaron bacilos Gram positivos, pleomórficos. La identificación de especie se realizó mediante el sistema RAPID ID 32 A, sistema para bacterias anaerobias. Las pruebas para la susceptibilidad antimicrobiana se realizaron siguiendo las recomendaciones del CLSI, por el método de dilución en agar, en placas de brucella suplementado con hemina y vitamina k3, se inocularon  $10^5$  UFC, se incubaron a 36°C en aerobiosis por 48 horas. Se utilizaron como cepas de referencia a *Cutibacterium acnes* ATCC 11827 y *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

*Cutibacterium acnes* fue resistente a: eritromicina 35%, clindamicina 15%, doxiciclina 9%, tetraciclina 8% y minociclina 1%. También se detectaron aislamientos con resistencia cruzada a eritromicina - clindamicina 12% y doxiciclina y tetraciclina 6%. El 46% de los aislamientos con historial de uso de antibióticos demostraron resistencia, y el 29% de los aislamientos que no tenían antecedentes de tratamiento. Como conclusión se obtiene que la resistencia antimicrobiana de *C. acnes* en la población colombiana estudiada tiene menor prevalencia que en la europea.

Lavergne V, et al [5], realizaron un estudio retrospectivo en Canadá, para proporcionar una descripción más precisa del impacto clínico de *C. acnes*, en pacientes con cirugía ortopédica con el objetivo de determinar: (i) si hay una diferencia clínica entre infección y contaminación, (ii) si hay una diferencia clínica entre monoinfección, y coinfección de *C. acnes*, en pacientes que asistían al Hospital Le Sacré Coeur – Montreal en el periodo de mayo 2008 a 30 de abril del 2013. Todos los pacientes fueron identificados a través de las bases de datos local del hospital. Se incluyeron todos los pacientes con al menos un cultivo positivo para *C. acnes*, en cualquier muestra de tejido ortopédico intraoperatorio, para efectos de establecer diferencias entre infección o contaminación, se definió como el *aislamiento* de *C. acnes* de  $\geq 2$  especímenes, o en un solo ejemplar, en la presencia de hallazgos perioperatorios típicos y / o signos locales de infección.

Las muestras ortopédicas fueron trasladadas en condiciones anaeróbicas, posteriormente se inocularon en medios bacteriológicos de rutina, incluyendo un agar CDC pre-reducido y un caldo CM, la incubación se realizó mínimo 7 días, se hizo una identificación rápida (bacilos Gram positivos, catalasa positiva en el 15%, e indol positivo) y una identificación confirmatoria con el kit de API Rapid ID 32 A (bioMérieux), no se realizaron pruebas de sensibilidad.

Como resultados del total de muestras analizadas, 68 tuvieron un cultivo positivo para *P. acnes*, y de éstas 35 realmente estaban se asociaron a infección. Las infecciones principalmente se dieron en varones, con predominio en los hombros y en un sitio que fue expuesto a una cirugía de implante

en el 91% de los casos. La coinfección con otros patógenos estuvo presente en el 31% de los pacientes (11/35). Al comparar los pacientes coinfectados por el *P. acnes*, y los que estaban mono infectados, estos últimos presentaron menos signos inflamatorios locales. La tasa de recidiva fue del 24% (8/35) y el único factor de riesgo para la recidiva fue la presencia de una mono infección.

La tasa de recurrencia microbiológica de esta bacteria fue 24%, asociada a subtipos de *C. acnes* con mayor grado de virulencia, y se presume que la elección de la terapia antimicrobiana también podría haber influido. Como recomendación se sugiere monitorear los cultivos durante 10 días para confirmar verdaderos negativos.

Kvich L, et al [7]. realizó un estudio en Dinamarca en el 2016, con el objetivo de verificar la presencia de *C. acnes* en caldos de tioglicolato reportados como negativos por el departamento de microbiología clínica para este microorganismo a los 5 días de incubación [6]. En el estudio fueron incluidas: muestras de tejido de sitios estériles del cuerpo (n= 298), tejido óseo (n=197) y material extraño (n=5). En total evaluaron 500 caldos de tioglicolato que fueron reportados como negativos después de incubarlos 5 días, los recogieron y los incubaron de 9 a 14 días. Las muestras se dividieron en dos grupos: grupo de experimento y el grupo control infectado, haciendo posible estimar el nivel de resultados positivos verdaderos y contaminación.

El aislamiento de *C. acnes* fue positivo en 10 de cada 151 pacientes (6,6%) en el grupo infectado y 1 de cada 138 participantes (0,7%) en el grupo de control. Se obtuvieron más aislamientos de *C. acnes* en el grupo infectado con una incubación de 14 días, en comparación a un periodo de incubación de 5 días (p 0,002). Además *C. acnes* se cultivó mejor a partir de tejidos estériles y tejidos óseo con el periodo de incubación de 14 días (p 0,04). En el estudio se concluye que los laboratorios de microbiología deben considerar la incubación del caldo Tioglicolato al menos

durante 14 días para detectar los verdaderos positivos y verdaderos negativos, especialmente cuando se trata de tejido óseo y su tejido circundante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar la eficiencia de tres medios de cultivo propuestos para el aislamiento microbiológico de *Cutibacterium acnes* provenientes de muestras biológicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analizar los diferentes medios descritos en protocolos encontrados en la literatura científica para el aislamiento bacteriológico de *Cutibacterium acnes*.
- Realizar los ensayos con los tres medios de cultivo propuestos para el aislamiento del *Cutibacterium acnes* provenientes de comedones en piel
- Evaluar la recuperación, viabilidad, pureza y rendimiento bacteriano de *Cutibacterium acnes* en los tres medios de cultivo propuestos.

### 3. MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)

Es uno de los microorganismos que más sobresale en la microbiota cutánea, se encuentra como comensal colonizando las áreas ricas en sebo y otros tejidos como: cavidad oral, tracto gastrointestinal y urogenital. Actúa como patógeno oportunista, asociado principalmente en la etiología del acné [13]

Filogenéticamente, pertenece a la familia *Propionibacteriaceae*, género *Cutibacterium*, especie *Cutibacterium acnes*. El género *Cutibacterium* está conformado por bacterias corineformes, Gram positivas, las especies más significativas son *C. acnes*, *C. granulosum* y *C. avidum*. Se distinguen por la formación de ácido propiónico y acetato como principales metabolitos de la degradación de glucosa. *Cutibacterium acnes* antes nombrado como *Bacillus acnes*, *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium parvum*. Es un bacilo pleomórfico, anaerobio facultativo; puede tolerar el oxígeno inclusive en un 100% de saturación, pero minimiza la tasa de crecimiento [14]. Es inmóvil, no produce esporas, no posee capsula, es  $\beta$  hemolítico, tiene la capacidad de formar biofilm, de tamaño pequeño y se agrupa en empalizadas o “letras chinas”.

Eady e Ingham en 1994 describen las enzimas que produce *C. acnes*: proteasas, catalasa, hialuronidasa, lipasa, fosfolipasa C, neuraminidasa, fosfatasa ácida. *C. acnes* tiene V biotipos (tabla 1) y II serotipos (tabla 2), la clasificación de biotipos está basado en la capacidad de fermentación de tres azúcares (ribosa, eritritol, sorbitol), los serotipos en la detección de la galactosa en la pared de las bacterias [15]. El biotipo con mayor aislamiento y relación con la severidad del acné vulgar es el número III [16]

**Tabla 1. Biotipificación de *C. acnes* (basado en el test de fermentación de azúcares).**

Biotipo	Ribosa	Eritritol	Sorbitol
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	+
IV	+	-	-
V	-	-	-

**Tabla 2. Serotipos de *C. acnes* (basado en la detección de galactosa en la pared).**

Serotipo	Relación con biotipo
I galactosa (+)	Biotipo I-II-III-IV-V
II galactosa (-)	Biotipo I-II

### ***3.1.1 Condiciones para el aislamiento***

La temperatura óptima para su desarrollo está en un rango de 35-37°C, es un microorganismo termosensible, por tanto, las temperaturas mayores a 38°C no permiten su desarrollo. *Cutibacterium acnes* está clasificado dentro de los microorganismos anaerobios, sin embargo, estudios recientes lo identifican con capacidad microaerofila, su incubación es viable en una atmosfera de 5 a 15% de O<sub>2</sub> y 5-10% de CO<sub>2</sub>, o en una atmosfera anaerobia, que contiene 5% de H<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> y 85-90% de N<sub>2</sub>. Puede sobrevivir hasta 8 meses bajo condiciones anaeróbicas sin subcultivo [17]. In vitro *C. acnes* tiene un crecimiento lento, el tiempo de incubación oscila 414 días mínimo [7]. Darle el tiempo pertinente al cultivo, es vital para aislar el microorganismo sin alteraciones de tipo morfológico y bioquímico; la velocidad y la viabilidad de recuperación está ligada a la composición del medio de cultivo y a las condiciones a las que se someta la muestra desde su toma hasta la siembra [18]

Los medios de cultivo que se utilizan con mayor frecuencia para el aislamiento de *Cutibacterium* son los que se utilizan comúnmente para anaerobios: agar brucella, este ha presentado problemas de variación con el tiempo y se contamina muy fácil, agar wilkins chalgreen, es más funcional cuando esta suplementado con sangre, infusión cerebro- corazón, agar sangre para anaerobios, el agar glicerol al 4%, agar tripticasa soya con extracto de levadura, agar chocolate, agar schaedler [ 1,2,11].

### **3.1.2 Metabolismo**

La nutrición microbiana reside en suministrar a la célula las sustancias que necesitan para su viabilidad. Los requerimientos nutricionales de cada grupo microbiano están delimitados por su genoma, el cual determina sus propiedades fenotípicas y estas a su vez direccionan el proceso de metabolismo que seguirá la bacteria, proporcionándole la capacidad para utilizar y transformar los compuestos que se encuentran en el ambiente en que se desarrolla [19].

La actividad metabólica de las *Cutibacterias* está dada por reacciones bioquímicas en ausencia de oxígeno. El ciclo específico y la principal ruta metabólica de carbono de las *Cutibacterias* es el ciclo Wood-Werkman, a través de esta vía, el piruvato se convierte en propionato. Otras vías que utiliza como alternativa según la disponibilidad de nutrientes, son la glucólisis y la de pentosa fosfato [20]. Por medio de la ruta Wood-Werkman se producen NADH, equivalentes reductores de NADPH, ATP y precursores de metabolitos, indispensables para biosíntesis de compuestos esenciales, aminoácidos, purinas, glicerol, ácidos grasos, vitaminas, N- acetil glucosamina, N- acetilmurámico, estos últimos importantes para la formación de peptidoglicano, y darle la estructura a la pared celular, en el proceso de división celular [21].

Las *Propionibacterias* tienen una mejor viabilidad cuando tienen al alcance carbohidratos como la glucosa, lactosa, glicerol, manosa, galactosa, fructosa utilizados en la fase exponencial; Cuando las bacterias agotan

estos nutrientes pueden activar rutas para utilizar inositol, L-arabinosa, eritritol, adonitol, esculina, xilitol, glucanato, D- fructuosa, logrando mantenerse en etapa de estacionaria [22-23].

Por otro lado *C. acnes* cuando está en los folículos pilosebáceos, utiliza lípidos que le sirven como estimulantes de crecimiento algunos de estos son: ácidos grasos, triglicérido, ácido oleico, glicerol y folatos [13]. Otros compuestos utilizados en el metabolismo son los aminoácidos por ejemplo triptófano, L-metionina, serina, arginina, fenilalanina, L-alanina y glutamato [23].

### **3.1.3 Factores de virulencia**

#### **3.1.3.1 Biofilm**

La formación de una biopelícula es el proceso en el cual los microorganismos se adhieren de una forma irreversible unidos a una superficie, produciendo polímeros extracelulares que facilitan la adherencia y la formación de una matriz que va a contener a la población de bacterias, otorgando protección. La penetración es restringida debido a que la matriz de exopolisacáridos limita la difusión de sustancias y la unión del antimicrobiano proporcionando una efectiva resistencia a las células en su interior, contra grandes moléculas como antimicrobianos, proteínas, lisozimas y complemento [24].

*Cutibacterium acnes* cuenta con genes que codifican para enzimas que están involucradas con la formación del biofilm tales como: glycoltransferasa, uridina difosfato-N-actetilglucosamina 2-epimerasa. Las proteínas, adhesinas y polisacáridos también ayudan en la formación [25].

Este proceso, desencadena una alteración en el fenotipo de las bacterias en cuanto a su tasa de crecimiento y a la transcripción horizontal de genes [24].

El biofilm bacteriano libera antígenos y estimula la producción de anticuerpos, inhibe la proliferación de los linfocitos T y los monocitos periféricos por inducción de prostaglandina E2, e interfiere sobre la blastogénesis de las células B y la coagulación. También parece afectar

adversamente la opsonización y la fagocitosis al inhibir la quimiotaxia, e induce la degradación e inhibe las actividades metabólicas dependientes de oxígeno de los leucocitos PMN, conduciendo a la muerte intracelular [24,25]. Adicional estimula respuesta inflamatoria produciendo liberación de enzimas que tienen un papel importante en la iniciación y mantenimiento de las lesiones en el acné [26].

### **3.1.3.2 Inducción a inflamación.**

*C. acnes* libera lipasas, factores quimiotácticos, metaloproteasas y porfirinas. Estos generan toxicidad, reducción de oxígeno y radicales libres, causando daño a las células del huésped como los queratinocitos, sebocitos. [26].

Su capacidad proinflamatoria es mayor a la de *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Estimula la expresión de marcadores de la inmunidad innata, como los Toll (TLR), péptidos antimicrobianos AMP, receptores activados por proteasas, metaloproteasas de la matriz MMP, Interleuquinas IL1,8,6,12 y TNF, regulando así la respuesta inflamatoria [16].

En cuanto a la respuesta inmune aún no se conoce con certeza la interacción de *C. acnes* se conoce que causa una sobreexpresión de moléculas como: E-selectina, molécula vascular de adhesión celular-1, molécula de adhesión intracelular. Las cuales provocan una infiltración por linfocitos TC4 + y macrófagos, lo que con lleva a una hiperqueratinización folicular. Este microorganismo también tiene resistencia a la fagocitosis [13,16].

### **3.1.4 Identificación**

La identificación microbiológica tiene dos momentos, (i) observación macroscópica y microscópica del microorganismo, *C. acnes* se caracteriza por tener colonias color blanco-crema con un diámetro de 0,05 mm,  $\beta$  hemolíticas. Con la tinción de Gram se observan bacilos Gram

positivos, pleomorfos agrupados en letras chinas. (ii) la identificación de especie se hace evaluando las reacciones bioquímicas o por medio de pruebas moleculares [ 1,27].

En el mercado existen kits que proporcionan pruebas bioquímicas de fácil manejo, entre ellos están Rapid ID, BBL Crystal, Remel ANA II, los cuales contienen substratos bioquímicos y enzimáticos, se evalúan según el uso que le de la bacteria al sustrato. Las pruebas que ayudan en la diferenciación de especies son: catalasa positiva, indol positivo, nitratos positivos, hidrólisis de gelatina [28].

### **3.2. El acné.**

El acné es considerado como uno de los trastornos más comunes de la piel, que afecta las glándulas sebáceas de la piel; está basado en una hiperproducción de sebo y la acción *Cutibacterium acnes* [26], es decir una enfermedad crónica multifactorial del folículo pilosebácea que se desarrolla principalmente en la pubertad y que con frecuencia produce impactos psicológicos y sociales en las personas con esta condición [29].

*C. acnes* es un patógeno oportunista implicado en el acné como uno de los principales factores que desarrollan la patología; el acné afecta áreas con densidades altas de folículos sebáceos; como la cara, parte superior del pecho y la espalda ; las manifestaciones y el tipo de clasificación según la evolución que pueden evidenciar, se describen en los cuadros 1 y 2 respectivamente [30-31].

**Cuadro 1. Manifestaciones clínicas del acné [31]**

<p><b>Comedones</b></p>	<p>Lesión básica.</p> <p>Cerrados: pequeños folículos tapados no expuesto a la superficie de la piel.</p> <p>Abiertos: caracterizado como puntos negros, son pequeños folículos con aberturas dilatadas sobre la piel. El color negro resulta de la oxidación de los desechos dentro del folículo.</p>
<p><b>Pápulas</b></p>	<p>Lesiones pequeñas, generalmente de color rojo, elevaciones elevadas de la piel.</p>
<p><b>Pústulas</b></p>	<p>Similares a las lesiones de las pápulas, pero presentan acumulación central de pus.</p>
<p><b>Nódulos / quistes</b></p>	<p>Son lesiones generalmente grandes, presentan hinchazones- inflamaciones dolorosas.</p>

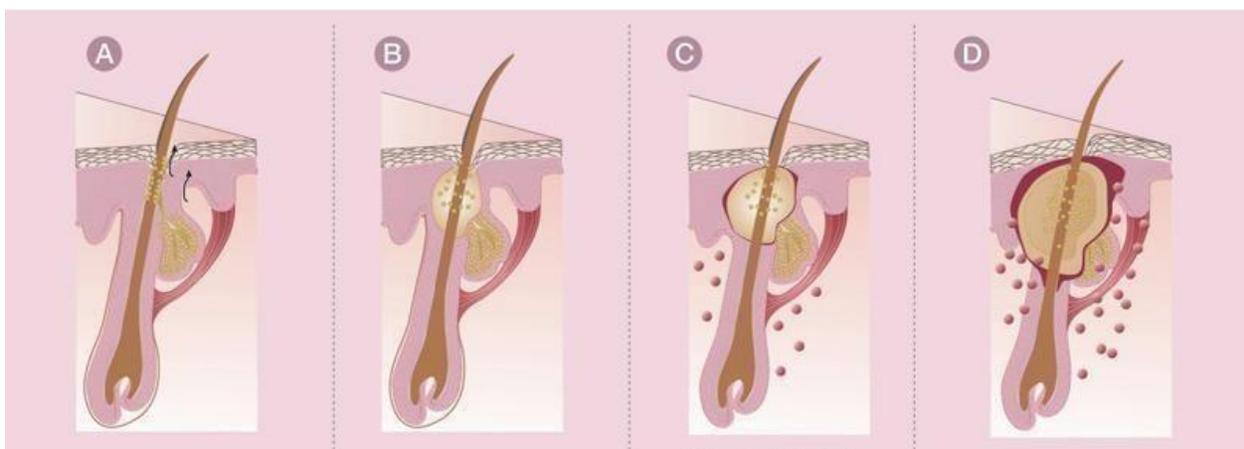
**cuadro 2. Evolución patología de acné. [31]**

<p><b>Leve</b></p>	<p><b>Moderado</b></p>	<p><b>Severo</b></p>
<p>Comedones Con pápulas inflamatorias ocasionales y pústulas.</p>	<p>Comedones con pequeñas y grandes pápulas inflamatorias y pústulas de desarrollo extenso.</p>	<p>Comedones y lesiones inflamatorias con nódulos y quistes con afectación facial y evidencia de cicatrización.</p>

### 3.2.1 Patogénesis del acné.

El acné se desarrolla a partir de la interacción entre múltiples factores influenciada por la actividad de la glándula sebácea, hormonas como factores endógenos y microorganismos que actúan sobre la glándula aumentando la producción de sebo relacionado con la hiperqueratinización que lleva a la formación de los comedones por acción hormonal y cambios en los lípidos que provocan la secreción de interleucinas bloqueando el folículo [25,31]; lo que da lugar a la formación del comedón y la inflamación estimulada por la colonización bacteriana que dependen de los linfocitos y macrófagos que estimulan los marcadores inflamatorios del folículo pilosebáceo [31].

La patogénesis del acné se caracteriza por el aumento en la producción de sebo por parte de las glándulas sebáceas, alteración en el proceso normal de queratinización, colonización folicular de identificar cuatro momentos durante la alteración folicular como se observa en la imagen1.



**Imagen 1. Pasos de la alteración folicular [32].**

Se evidencian 4 pasos en la alteración folicular: A, Colapso de la pared folicular, inflamación notable y cicatrización. B, formación de comedón con hiperqueratosis, células adheridas y secreción sebácea; C, la presencia de comedón con acumulación de células estimulado por secreción sebácea y expansión del folículo. D, Pápulas/pústulas con expansión adicional e inflamación de folículo.

Además de ser el agente causal del acné, *Cutibacterium acnes* se ve involucrado en otras patologías como microorganismo oportunista como pericarditis [14], la actividad microbiana de *C. acnes* es amplia y se ha demostrado que normalmente reside en el organismo y que es últimamente es uno de los principales agentes causantes de infecciones adquiridas en procedimientos clínicos invasivos, aunque las infecciones por *Cutibacterium acnes* se asocian predominantemente con un factor predisponente, algunas de estas se presentan en el cuadro 3.

**Cuadro 3. Infecciones que asocian a *C. acnes* como agente oportunista.**

Infecciones sistema nervioso central	Procedimientos neurológicos.	Capoor M, [4]
Endocarditis	Válvulas. Cirugías, procedimientos coronarios.	Dessinioti C.[26]
Osteomielitis	Punción lumbar.	Lavergne V,[5]
Endoftalmitis	Post-operatorio.	Sukas C,[17]
Infecciones articulares	Procedimientos quirúrgicos.	Butler-Wu; [6]; Kvich L [7]

### 3.3 Aislamiento microorganismos anaerobios

Los microorganismos anaerobios necesitan de una atmosfera sin oxígeno para su crecimiento a que actúa como tóxico es decir inhibidor del crecimiento, sin embargo, algunas pueden llegar a ser

tolerantes, en general poseen un metabolismo fermentativo, aunque también pueden obtener energía a partir de la respiración anaerobia; Sus requerimientos nutricionales son complejos y el lento crecimiento hace que su aislamiento sea difícil [1]. El crecimiento de bacterias anaerobias es limitado a zonas donde las concentraciones de oxígeno son bajas, pueden formar parte de la flora bacteriana normal como comensales y mutualistas; Son frecuentes en la boca, vías respiratorias altas, vagina e intestino [24].

Algunos microorganismos anaerobios se desarrollan a niveles de oxígeno de 0.03%, los obligados moderados también denominados aerotolerantes crecen aun exponiéndose alrededor del 6% de oxígeno; la tolerancia al oxígeno se ve relacionada a la producción de enzimas que actúan sobre la toxicidad de los productos de óxido-reducción; por el contrario, los microorganismos anaerobios facultativos crecen bajo condiciones anaerobias o aerobias determinadas [1, 18].

### ***3.3.1 Medios de cultivo que favorecen el aislamiento de C. acnes.***

El aislamiento de microorganismos anaerobios es considerado difícil ya que el metabolismo anaerobio es menos eficiente que el aerobio, de este modo para recuperar estos microorganismos es necesario utilizar un medio adecuado que permita el desarrollo y proporcione las exigencias nutricionales de los microorganismos como medios enriquecidos selectivos y diferenciales, además de tener en cuenta otros factores como temperatura, incubación y otros aporte así como factores de crecimiento específicos[34]. Algunos de los medios comúnmente utilizados en la recuperación de anaerobios son:

Medio de Schaedler: Es un medio nutritivo desarrollado para el crecimiento de anaerobios obligados, con la adición de vitamina K1 y hemina, tres peptonas proporcionan los nutrientes. La glucosa es una fuente de energía, se incluye el tampón Tris para evitar una reducción excesiva del pH durante la fermentación de glucosa. El extracto de levadura es una rica fuente de vitaminas. La

hemina y la sangre de carnero favorecen el crecimiento adicional [34]. La inclusión de vitamina K es una modificación adicional; últimamente se utiliza ampliamente como medio no selectivo altamente nutritivo para el aislamiento de anaerobios estrictos.

Medio Tioglicolato enriquecido: Este medio favorece el crecimiento de microorganismos, incluidos los anaerobios estrictos, sin incubación en una atmósfera anaerobia y reduce el potencial de oxidación-reducción [34].

Agar Brucella: Este un medio favorece el crecimiento de microorganismos exigentes debido asucontenido de peptonas, dextrosa, extracto de levadura y sangre. Las peptonas suministran nitrógeno orgánico. El extracto de levadura es una rica fuente de vitaminas del complejo B. La glucosa se utiliza como fuente de energía. La sangre de caballo aporta los factores de crecimiento necesarios en algunos microorganismos [34].

Wilkins Chalgren: Es un medio de cultivo utilizado en aislamiento primario de anaerobios estrictos involucrados en infecciones a partir de muestras clínicas. Las peptonas proporcionan los nutrientes y contiene las vitaminas necesarias para los anaerobios estrictos. La sangre de caballo brinda nutrientes adicionales para favorecer el crecimiento de anaerobios exigentes [34]. Formula en g/L:

Triptona10, peptona de gelatina 10.0, extracto de levadura 5.0, glucosa 1.0, cloruro de sodio 5.0,

L-arginina 1.0, piruvato de sodio 1.0, menadiona 0.0005, hemina 0.0005, agar10.0 [35].

Los medios para el cultivo bacteriano son medios que son enriquecidos la mayoría de veces, en el cuadro 4 ; se encuentran cuáles son los medios con mayor frecuencia utilizados en las investigaciones para el aislamiento de *C.acnes*.

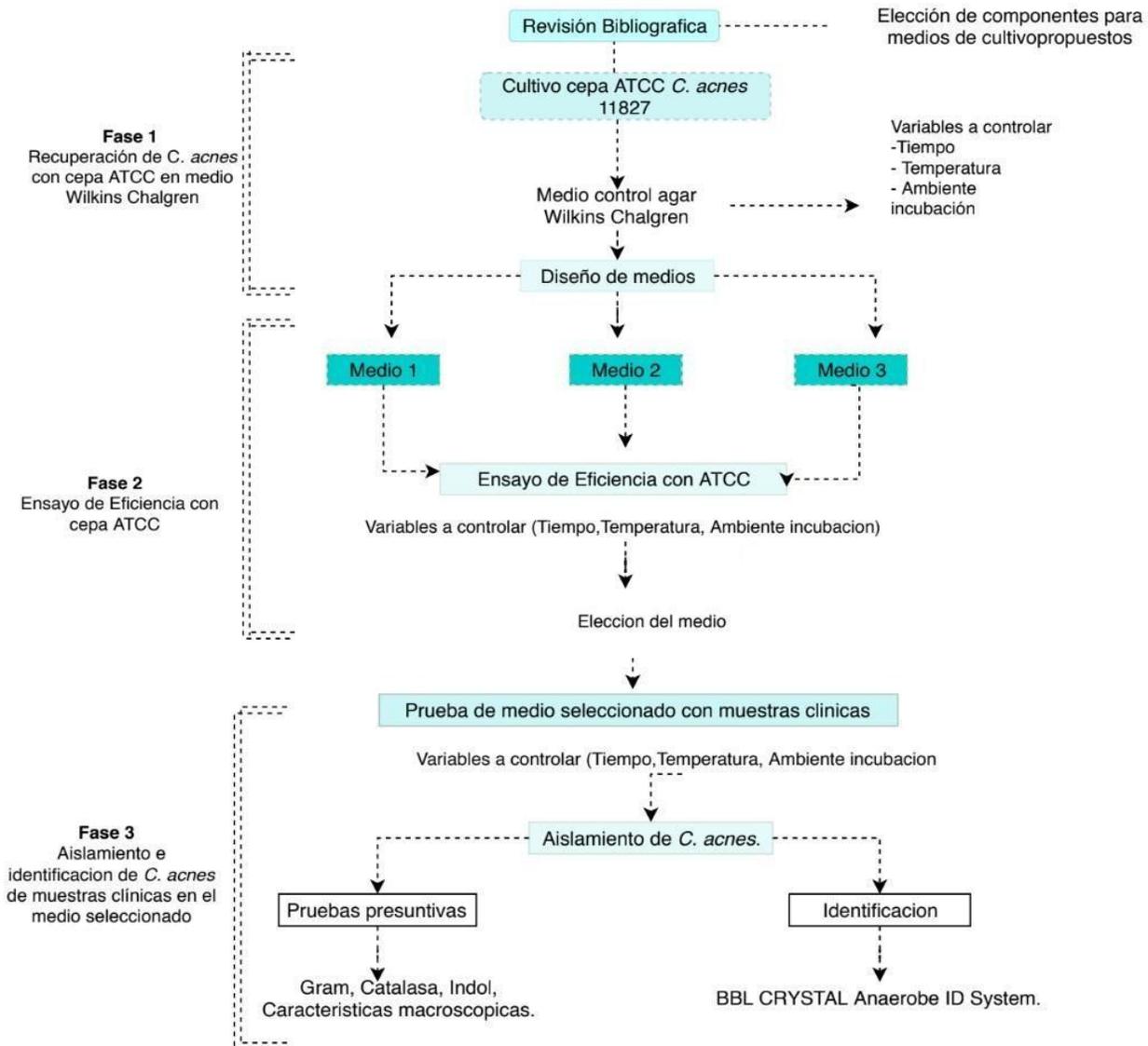
**Cuadro 4. Medios de cultivo utilizados en para el aislamiento de *C.acnes***

Medio de cultivo	Descripción	Composición	Referencia /año
Wilkins	Es un medio de cultivo utilizado en aislamiento primario de anaerobios estrictos involucrados en infecciones a partir de	Triptona, peptona de gelatina, extracto de levadura, glucosa , cloruro de sodio , L-arginina , piruvato de sodio , menadiona	3,11/1990 - 2002 muestras clínicas.
Brucella	Este un medio favorece el crecimiento de microorganismos exigentes debido a su contenido de	Digerido pancreático de caseína, digerido péptico de tejido animal, glucose, extracto de levadura, cloruro sódico, peptonas, dextrosa, extracto bisulfito sódico , agar, sangre de levadura y sangre. de caballo.	3,11,12/1990- 2002- 2013
Schaedler	Es un medio nutritivo para el selective de anaerobios estrictos.	Digerido pancreático de caseína, L-cistina, digerido péptico de tejido animal, Hemina, digerido papaico de harina de soja, vitamina K1, glucosa , tri-hidroximetilaminometano, extracto de levadura, agar, Cloruro sódico, Fosfato dipotásico, sangre de cordero desfibrinada 5% .	desarrollado aislamiento no 1,35,36/ 2017
Tioglicolato	favorece el crecimiento de los anaerobios estrictos, sin anaerobia reduce el potencial	Extracto de levadura, Cloruro sódico, digerido pancreático de caseína, Tioglicolato sódico, en una dextrose, Resazurina, L- y cistina, agar. de	microorganismos, incubación L- atmósfera oxidaciónreducción. 7 / 2016

Medio altamente nutritivo Infusión de cerebro y corazón utilizado para el de, Digerido péptico, Digerido
Caldo y agar aislamiento de pancreático de caseína, Cloruro 38, 3 /1990 - BHI (Infusión microorganismos sódico, Glucosa, Fosfato 2018 cerebro exigentes, presentes en disódico de hidrógeno. corazón) una amplia variedad de muestras clínicas
Medio sólido, utilizado Extracto de levadura, para el aislamientos de peptona, glucosa, almidón RCA anaerobios, especialmente soluble, cloruro de sodio, (Clostridian <i>Clostridium</i> acetato de sodio, clorhidrato 38,37 / 2018- reforzado) de cisteína, agar con un pH 2017 $6.8 \pm 0.2$
Caldo BHI-E Infusión de cerebro y corazón Infusión de, Digerido péptico, Digerido cerebro Es el mismo BHI pancreático de caseína, Cloruro Corazón , Suplementado con 5% de sódico, Glucosa, Fosfato suplementado yema de huevo, utilizada disódico de hidrógeno. 5% de con 5% de como fuente de lípidos. yema de huevo 38/2018 yema de huevo
Modelos de Modelo representativo de Tripalmitina, ácido palmítico, Sebos las condiciones colesterol,acetato tocoferol , artificiales encontradas en la unidad trioleína, aceite de jojoba y 38/2018 pilosebásea, escualeno

## 4. DISEÑO METODOLOGICO

Se desarrolló el siguiente esquema metodológico el cual está dividido en tres fases, para cumplir los objetivos, con el fin de observar la eficiencia de los medios de cultivo propuestos. Fig1.



**Figura 1. Diseño Metodológico.**

La figura 1. Describe las tres fases donde se llevaron a cabo los ensayos.

**4.1 Tipo de estudio:** descriptivo, longitudinal y prospectivo.

#### **4. 1. 1. Universo:**

Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias anaerobias.

#### **4.1. 2. Muestra**

Tres medios de cultivo propuestos para el aislamiento de *Cutibacterium acnes*.

#### **4.2. Criterios de inclusión:**

Medios de cultivo propuestos en este ensayo para la recuperación de *Cutibacterium acnes* condicionados a los requerimientos nutricionales del microorganismo.

- Componentes que, según la literatura, proporcionen nutrientes para el aislamiento in vitro de microorganismo anaerobios, como: proteínas, sales, azúcares, vitaminas.
- Suplementos que brinden enriquecimiento de los medios, como: sangre de cordero al 5%.

##### **4.2.1. Criterios de exclusión:**

- Suplementos que por su composición puedan modificar el pH del medio.
- Suplementos que muestren toxicidad para el microorganismo.

#### **4.3. Población.**

Tres medios de cultivo propuestos en este ensayo, para el crecimiento *C. acnes*.

#### **4.4. Hipótesis**

Los tres medios de cultivo propuestos preparados con diferentes componentes que de manera distribuida se diseñan en tres fórmulas de acuerdo con la naturaleza, fisiología y metabolismo del microorganismo, le proporcionan las condiciones *que C. acnes* requiere para crecer de manera eficiente, lo que permite y facilita su recuperación.

## **4.5. Variables**

Dependiente:

- Cepas de *Cutibacterium acnes*.
- Eficiencia.
- Reproducibilidad.

Independiente:

- Medios de cultivo.
- Condiciones de aislamiento: temperatura, tiempo, atmósfera.

## **4.6. Indicadores**

Recuperación (UFC) en cada uno de los medios propuestos en este ensayo, preparados con diferentes componentes de acuerdo con la naturaleza, fisiología y metabolismo del microorganismo.

## 5. PROCEDIMIENTOS

### 5.1. Revisión de la literatura

Para la realización de este ensayo inicialmente se revisó la literatura científica para conocer los diferentes medios de cultivo tanto comerciales como no comerciales para el aislamiento de *C. acnes*, con el objetivo de escoger los componentes nutricionales indispensables para su crecimiento y que favorezcan su aislamiento. De tal forma que se eligieron los componentes para la base de los tres medios y los componentes diferenciales para cada uno de los tres medios de cultivo propuestos (Medio1, Medio 2, Medio 3) según la literatura.

#### 5.1.1. Componentes seleccionados para cada uno de los medios de cultivos propuestos.

##### Tabla 3. Composición de los tres medios.

La tabla 3. contiene la fórmula de los tres medios de cultivo propuestos según los componentes seleccionados a partir de la revisión de los medios descritos en la literatura de tipo comercial.

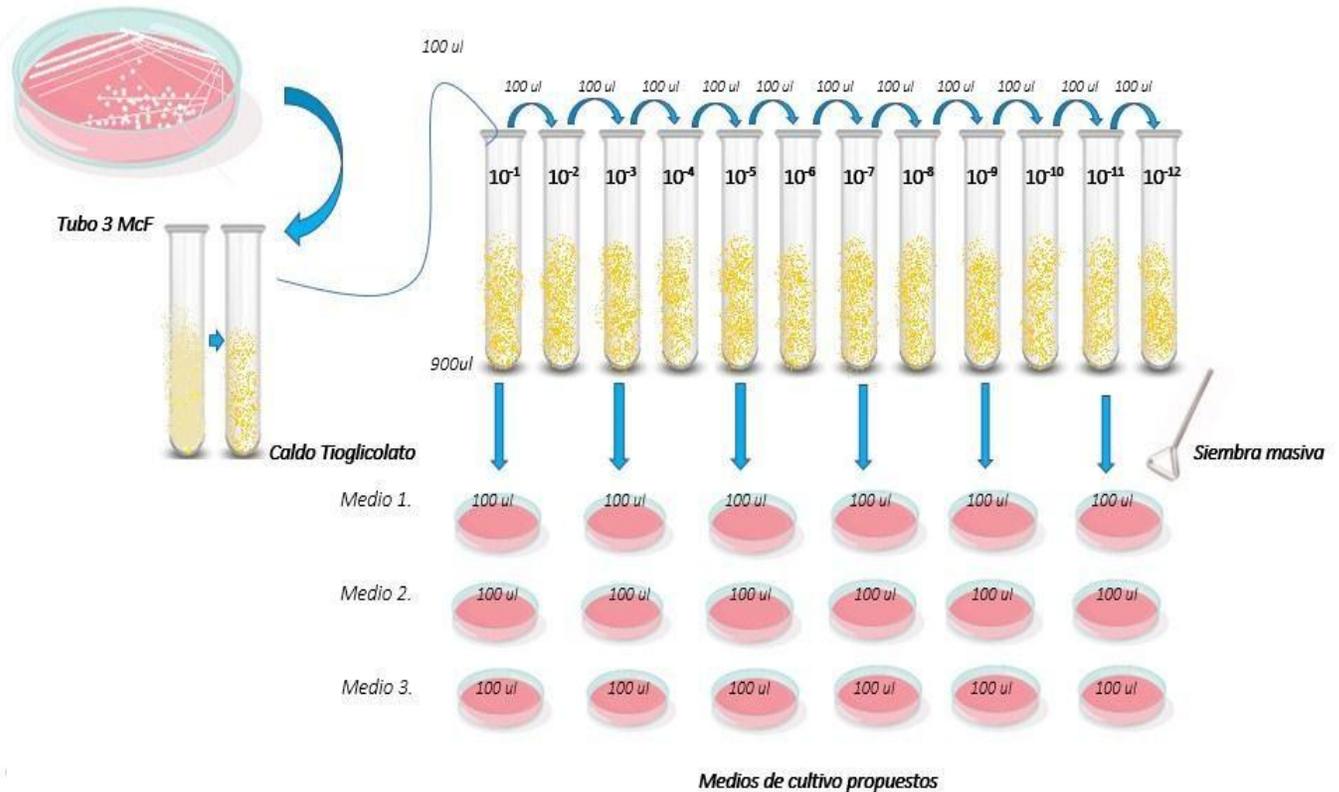
Componentes por litro de medio					
Medio No.1		Medio No. 2		Medio No.3	
Agar-agar	16g	Agar-agar	16g	Tripticasa soya agar	16g
Extracto de levadura	5.5g	Extracto de levadura	5.5g	Triptona	5.5 g
Glucosa	1.1g	Glucosa	1.1g	Extracto de levadura	5.5 g
Cloruro de Sodio	5.5g	Peptona de caseína	11g	Cloruro de sodio	5.5 g
Hemina	0.005g	Cloruro de Sodio	5.5g	Hemina	0.005g
Glicerol	11ml	Hemina	0.005g	Vitamina K	0.1ml
Sangre de cordero	5%	Glicerol	11ml	Sangre de cordero	5%
		Sangre de cordero	5%		
Ajustados a pH: 7.1					

## **5.2 Fase 1. Recuperación de la cepa *C. acnes* ATCC 11827 en el Medio Wilkins Chalgren.**

La cepa ATCC 11827 de la casa comercial KWIKSTIK comprada por la Universidad Nacional para este ensayo, es una cepa liofilizada que sembró en dos cajas con agar Wilkins Chalgren, controlando ambiente de incubación, temperatura y tiempo: se incubó en condiciones anaerobiosis en jarra de anaerobiosis, a 37°C por 7 días, luego de su incubación se congeló a -70° C en medio de leche descremada. Para los ensayos se tomó un vial de los previamente congelados donde se confirmó el género y la especie de *Cutibacterium acnes* mediante la coloración de Gram y pruebas bioquímicas BBL CRYSTAL Anaerobe ID System (Becton Dickinson).

## **5.3 . Fase 2. Ensayo de eficiencia de los tres medios de cultivo propuestos con la cepa *C. acnes* ATCC 11827.**

Para el ensayo de productividad se realizaron diluciones en base 10 en caldo tioglicolato reducido, a partir de una suspensión bacteriana correspondiente al tubo No. 3 de la escala de McFarland ( $9,0 \times 10^8$  UFC/ml), de las cuales se utilizaron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-11}$ , se sembró 100 ul en forma masiva con asas de Drigasky en las placas de los medios No. 1, No. 2 y No. 3. Se incubaron en anaerobiosis a 37° C. Se revisó el crecimiento bacteriano a los 5, 7 y 10 días. Se evaluó el crecimiento en cada uno de los medios observando la viabilidad, pureza y rendimiento de los días a partir del crecimiento obtenido para seleccionar el mejor medio de cultivo, los ensayos se realizaron por triplicado, luego de los ensayos se seleccionó el medio Número 1 ya que fue el medio que optimizó el desarrollo de *C. acnes*. Fig2.



**Figura 2. Ensayo de eficiencia de los tres medios de cultivo propuestos con la cepa *C. acnes* ATCC 11827.**

### **5.4. Fase 3. Aislamiento e Identificación de *C. acnes* a partir de muestras clínicas.**

Las muestras clínicas seleccionadas correspondieron a 10 muestras de comedones de individuos con acné, con edades que oscilaron entre los 18 hasta los 25 años, diagnosticados con acné y que no estaban en tratamiento antibiótico en los últimos tres meses, quienes firmaron el consentimiento informado a participar en la investigación. (Anexo 1); las muestras se sembraron en caldo tioglicolato como alternativa de recuperación y en el medio seleccionado, Medio Numero 1 de acuerdo con el rendimiento obtenido con la cepa de *C. acnes* ATCC 11827, para evaluar el desempeño del medio de cultivo con muestras de comedones de la piel.

#### ***5.4.1. Procedimiento para la toma de muestra de Comedones de piel.***

1. Alistar previamente los materiales.
2. Explicar el procedimiento al paciente y solicitar el consentimiento informado.
3. Rotular correctamente los medios donde se inoculará la muestra.
4. Localizar la lesión donde se va a extraer el material. (evidente inflamación y producción de materia)
5. Realizar una limpieza previa a la extracción con una gasa y agua destilada estéril.
6. Con ayuda de un extractor de comedones metálico estéril, ejercer presión sobre la piel que rodea a la lesión de acné para la extracción de la muestra.
7. Recolectar la muestra con un escobillón estéril, y presionar con una torunda de algodón aproximadamente 40seg.
8. Inocular la muestra directamente en el caldo tioglicolato y en las cajas de cultivo.
9. Incubar en anaerobiosis a 37°C.
10. limpiar el puesto de toma de muestra; desechar escobillones, gasas y algodón.

#### ***5.4.2. Cultivo de muestras de comedones de piel***

La muestra de cada uno de los pacientes se inoculó en caldo tioglicolato reducido y se sembró dos cajas del medio de cultivo seleccionado, los cuales se colocaron en jarras con atmósfera anaeróbica por 5 días a 37° C. Después de 5 días se analizaron los cultivos mediante observación microscópica (coloración de Gram) y macroscópica (estereomicroscopio). Posteriormente se realizó el aislamiento de las UFC características de *C. acnes* y se le realizaron las siguientes pruebas: Coloración de Gram, Prueba de la catalasa, prueba de indol y pruebas bioquímicas de confirmación con paneles BBL CRYSTAL Anaerobe ID System (Becton Dickinson ). Se observó el cambio de color en los diferentes pozos de reacción (reacción cromogénica) y con luz UV (reacción fluorogénica). El número de los códigos resultantes se introdujeron en el software ofrecido por la casa comercial.

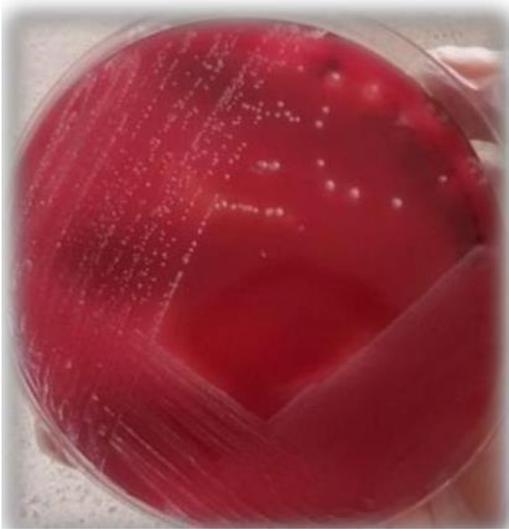
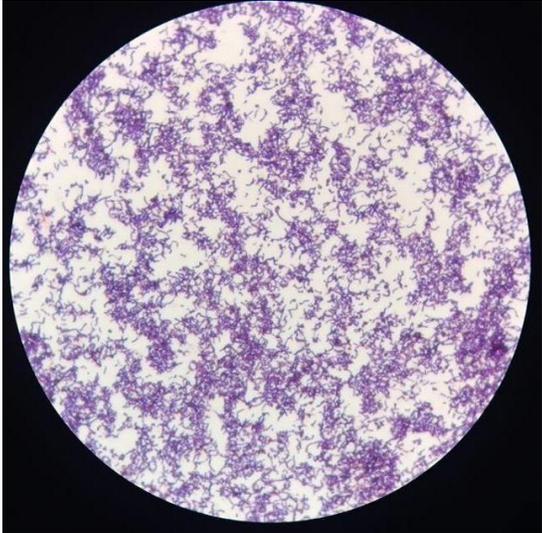
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Revisión Bibliográfica

A partir de la revisión bibliográfica se tomaron los componentes de los medios de cultivo descritos para el aislamiento de *C. acnes* y se diseñó tres propuestas de medio de cultivo Medio 1, Medio 2, Medio 3; el medio de cultivo tomado como control de aislamiento del microorganismo fue el Agar Wilkins Chalgren.

### 6.2. Fase1. Recuperación de la cepa *C. acnes* ATCC 11827 en el Medio Wilkins Chalgren.

La cepa creció luego de 7 días de incubación, sus características micro y macroscópicas fueron acordes con *C. acnes*, en la figura 3, se observa el crecimiento de *C. acnes* en el medio Wilkins Chalgren tomado como medio control.

DESCRIPCION	GRAM
Colonias pequeñas redondas convexas, cremosas y de color blanco.	Bacilos Gram positivos pleomorficos.
	

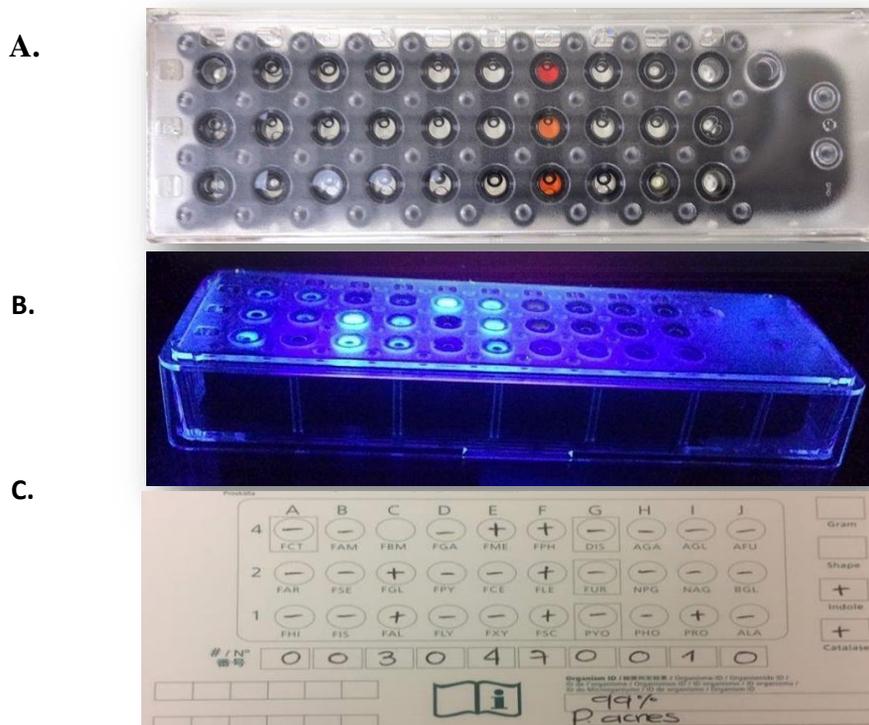
**Figura 3. Crecimiento de *C. acnes* ATCC 11827 en agar Wilkins Chalgren.**

La tabla 4 describe el código y el porcentaje de la identificación realizada a la cepa ATCC que se recuperó en el medio Wilkins Chalgren por la técnica BBL CRYSTAL.

**Tabla 4. Identificación de *C. acnes* cepa ATCC 11827 por técnica cromogénica y de fluorescencia.**

MUESTRA	CODIGO de identificación	MICROORGANISMO	PORCENTAJE de identificación
ATCC	0030470010	<i>Cutibacteriumacnes</i>	99%

En la imagen 2, se observa el resultado del panel de identificación para la cepa ATCC 11827; (A) resultado colorimétrico, (B) resultado fluorescencia, (C) formato de resultado de las técnicas obtención del código.



**Imagen 2. Panel de identificación BBL CRYSTAL Anaerobe ID System.**

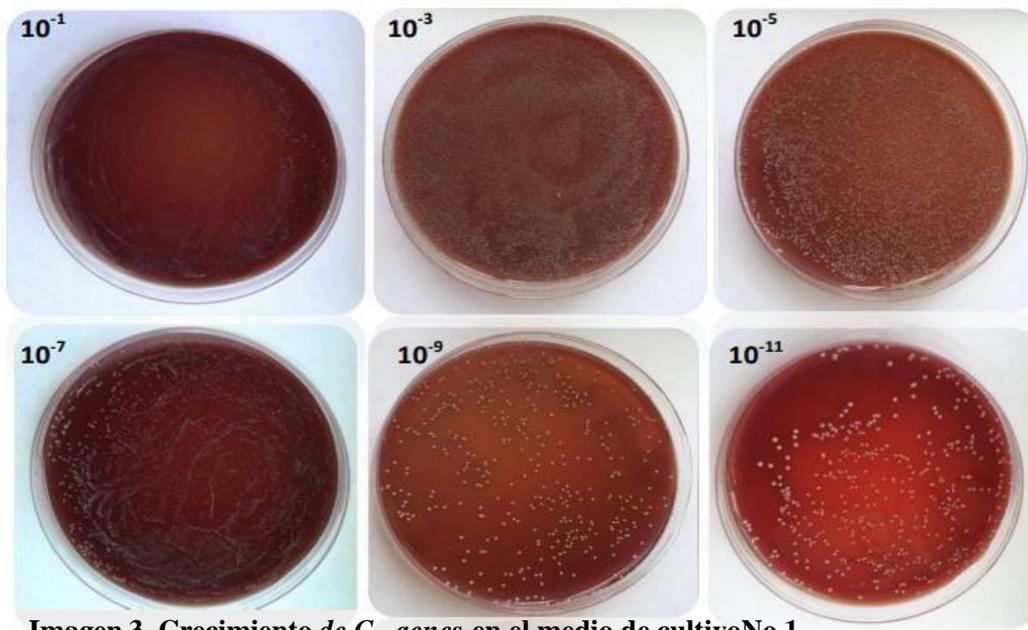
### 6.3. Fase 2. Ensayo de Eficiencia de medios propuestos con la Cepa ATTC 11827 de *C. acnes*.

Luego de una incubación de los medios de cultivo 1, 2,3 inoculados con la cepa ATCC 11827 Por 10 días en anaerobiosis a 37° C, se evaluó la eficiencia, obteniendo lo siguiente. La tabla 5 describe los datos del resultado del crecimiento en UFC de la ATCC en las diferentes diluciones en el medio No. 1. durante los días 5, 7 y 10 de incubación.

**Tabla 5. Crecimiento de *C. acnes* cepa ATCC 11827 en el medio de cultivo No. 1.**

DIA \ DIL	5 DIAS	7 DIAS	10 DIAS
	UFC	UFC	UFC
10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-3</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-5</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-7</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-9</sup>	303	341	341
10 <sup>-11</sup>	<b>187</b>	<b>216</b>	<b>220</b>

En la imagen 3, se observa un buen crecimiento. El crecimiento bacteriano es óptimo y muestra las características macroscópicas de *C. acnes*. Las condiciones del medio de cultivo le permitieron tener crecimiento en todas las diluciones (10<sup>-1</sup> hasta la 10<sup>-11</sup>).



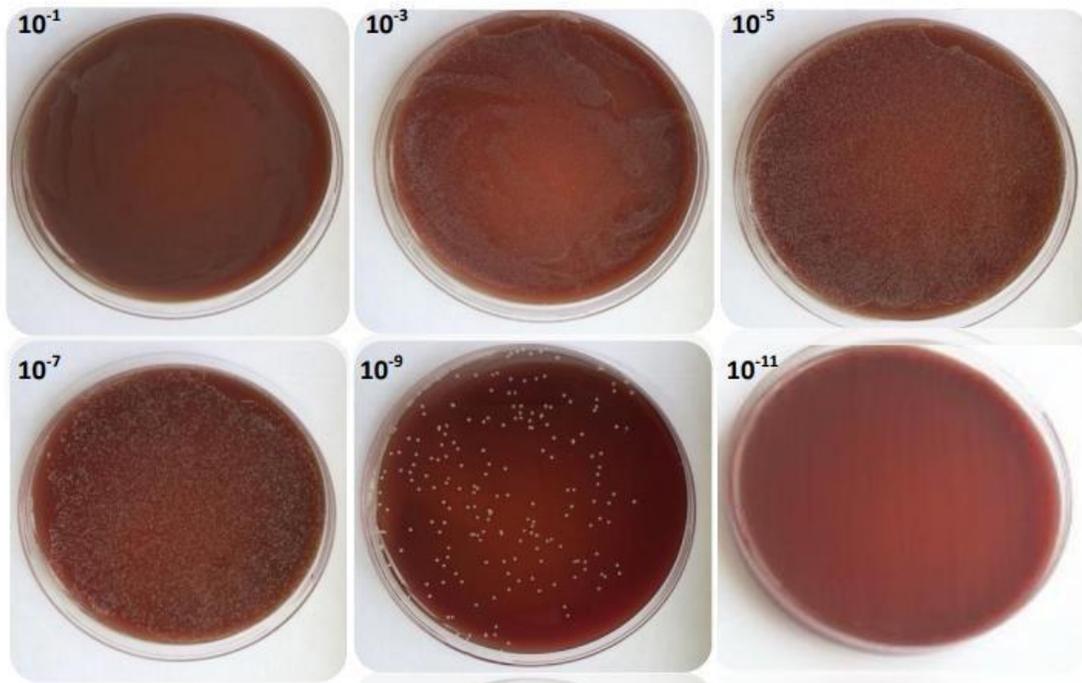
**Imagen 3. Crecimiento de *C. acnes* en el medio de cultivo No.1**

La tabla 6, describe los datos del resultado del crecimiento en UFC de la cepa ATCC en las diferentes diluciones en el medio No. 2, durante los días 5, 7 y 10 de incubación.

**Tabla 6. Crecimiento de *C. acnes* cepa ATTC 11827 en el medio de cultivo No.2**

DIA DIL	5 DIAS	7 DIAS	10 DIAS
	<b>UFC</b>	<b>UFC</b>	<b>UFC</b>
10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-3</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-5</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-7</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
<b>10<sup>-9</sup></b>	<b>89</b>	<b>138</b>	<b>138</b>
10 <sup>-11</sup>	0	0	0

En la imagen 4, se observa un crecimiento menor con las características macroscópicas de *C. acnes*. Las condiciones del medio de cultivo le permitieron tener crecimiento, pero en un tiempo más prolongado que con relación al medio No 1 según los resultados en el número de UFC en los días de incubación, y se obtuvo crecimiento hasta la dilución 10<sup>-9</sup> y en la dilución 10<sup>-11</sup> ya no se observa crecimiento.



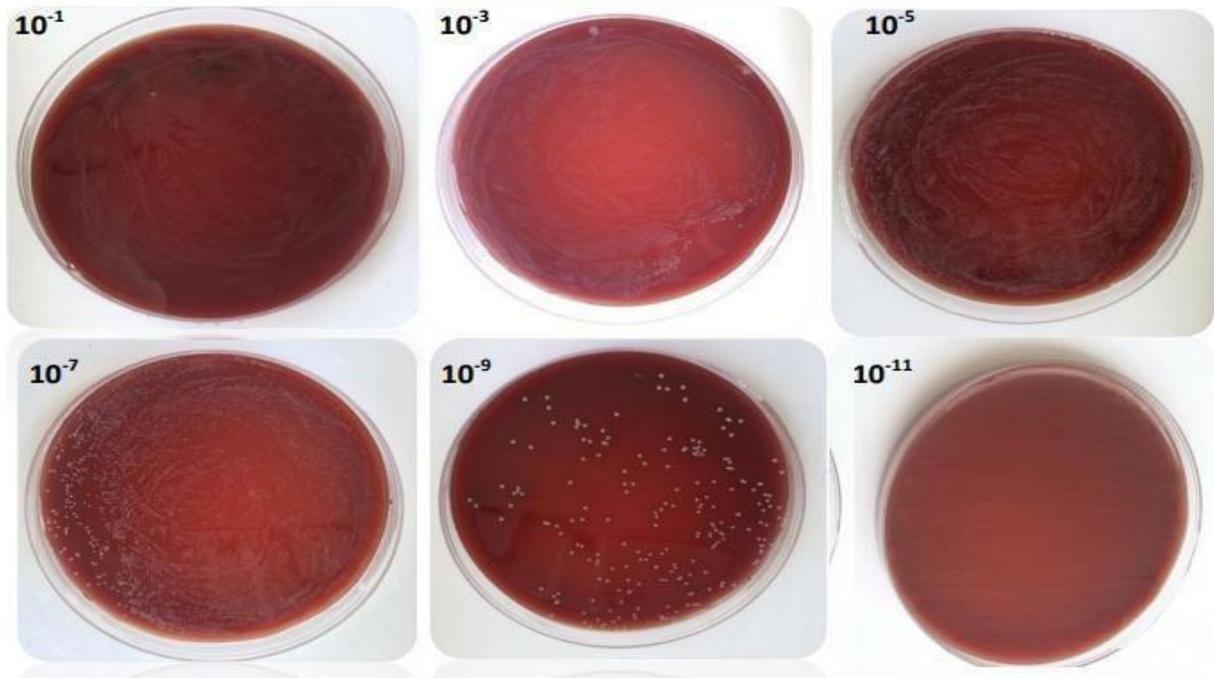
**Imagen 4. Crecimiento de *C. acnes* en el medio de cultivo No.2**

La tabla 7 describe los datos del resultado del crecimiento en UFC de la cepa ATCC en las diferentes diluciones en el medio No. 3. durante los días 5, 7 y 10 de incubación.

**Tabla 7. Crecimiento de *C. acnes* ATCC 11827 en el medio de cultivo No. 3.**

DIA \ DIL	5 DIAS	7 DIAS	10 DIAS
	<b>UFC</b>	<b>UFC</b>	<b>UFC</b>
10 <sup>-1</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-3</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-5</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-7</sup>	Incontables	Incontables	Incontables
10 <sup>-9</sup>	<b>37</b>	<b>85</b>	<b>112</b>
10 <sup>-11</sup>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

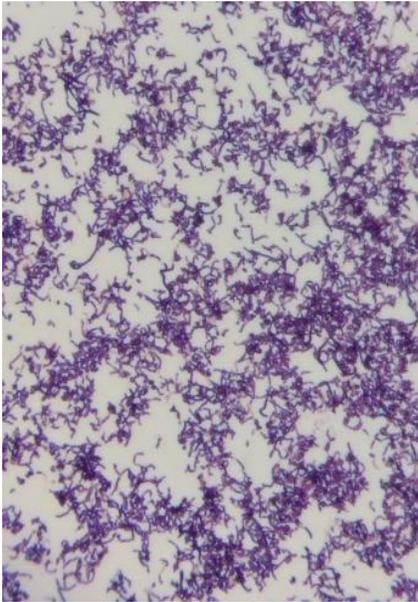
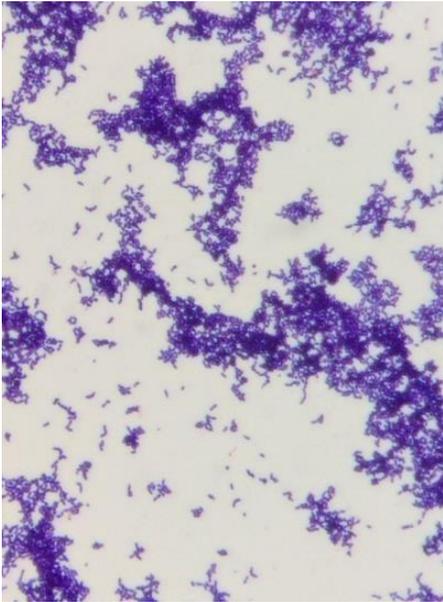
En la imagen 5, se observa crecimiento más lento, con las características macroscópicas de *C. acnes*. Las condiciones del medio de cultivo le permitieron tener crecimiento, aunque más escaso que en los medios 1 y 2. El crecimiento se obtuvo hasta la dilución 10<sup>-9</sup> y en la dilución 10<sup>-11</sup> ya no se observa crecimiento.



**Imagen 5. Crecimiento de *C. acnes* en el medio de cultivo No.3**

### 6.3.1. Coloración de Gram *Cutibacterium acnes* en los medios de cultivo propuestos.

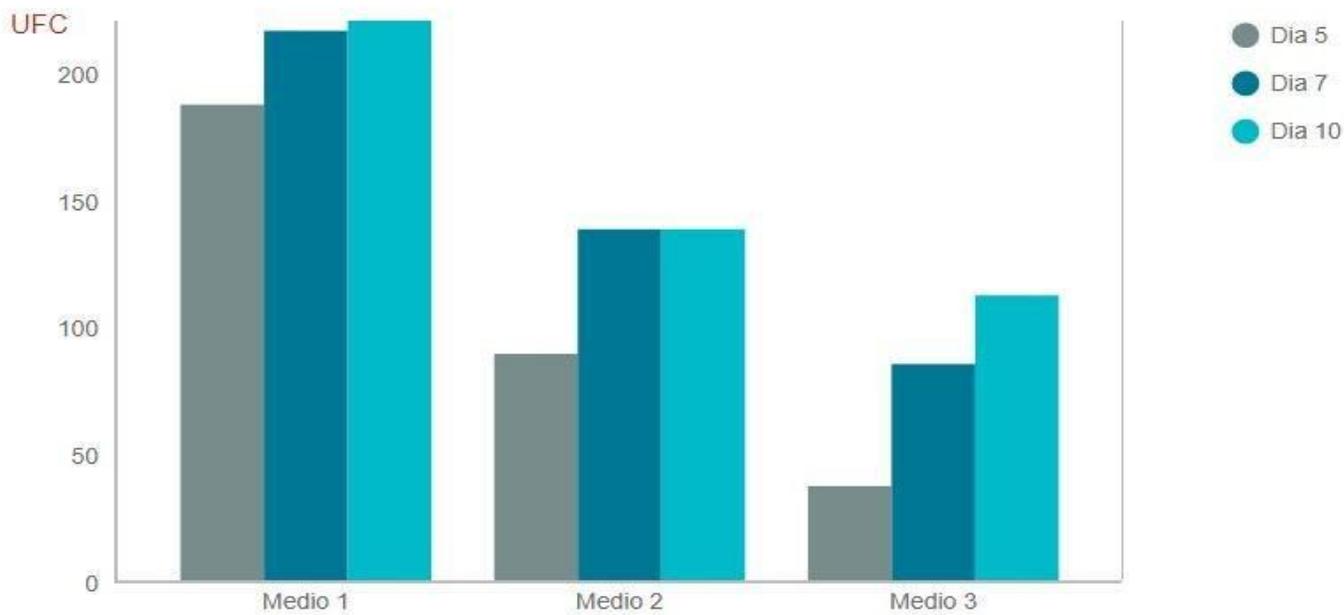
En el Gram del cultivo No 1, se observa una morfología más característica del bacilo en comparación con las del medio 2 y 3. Los bacilos del medio 3, son de tamaño mucho más pequeño casi como cocobacilos. Fig4.

MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO 3
Bacilos curvos Gram positivos pleomórficos (Agrupados como letras chinas).		
		

**Figura 4.** Coloración de Gram de los diferentes cultivos de *Cutibacterium acnes* ATCC 11827 en los medios 1, 2 y 3.

En la gráfica 1, se observa las UFC de *C. acnes* durante los días 5,7 y 10 de incubación. Se obtuvo mayor recuperación en el medio de cultivo No.1, en este medio *C. acnes* se recupera desde el quinto día, y en general el medio muestra buena eficiencia y productividad. El medio No.2 y 3 presentaron una menor recuperación y en un tiempo más prolongado.

**Gráfica 1. Crecimiento en UFC de cepa *C. acnes* ATCC 11827 en los medios propuestos durante los días de incubación.**



### 6.4. Fase 3. Aislamiento e Identificación de *C. acnes* a partir de comedones de la piel de la cara (muestras clínicas), en el Medio Seleccionado (Medio No. 1).

La muestra de cada uno de los pacientes se inoculó en caldo tioglicolato reducido como soporte alternativo por si no se obtenía recuperación en el medio en estudio. Se eligió el medio de cultivo No. 1 por su buena eficiencia en la recuperación de *C. acnes* cepa ATCC 11827.

En la tabla 8, se describen los resultados del crecimiento bacteriano con sus características macroscópicas y microscópicas en el medio No .1, a partir de muestras de comedones de la piel de la cara de pacientes voluntarios. En esta tabla se puede evidenciar que las muestras 4 y 7 presentan características macroscópicas y microscópicas diferentes a *C. acnes* y las demás muestras son características del microorganismo.

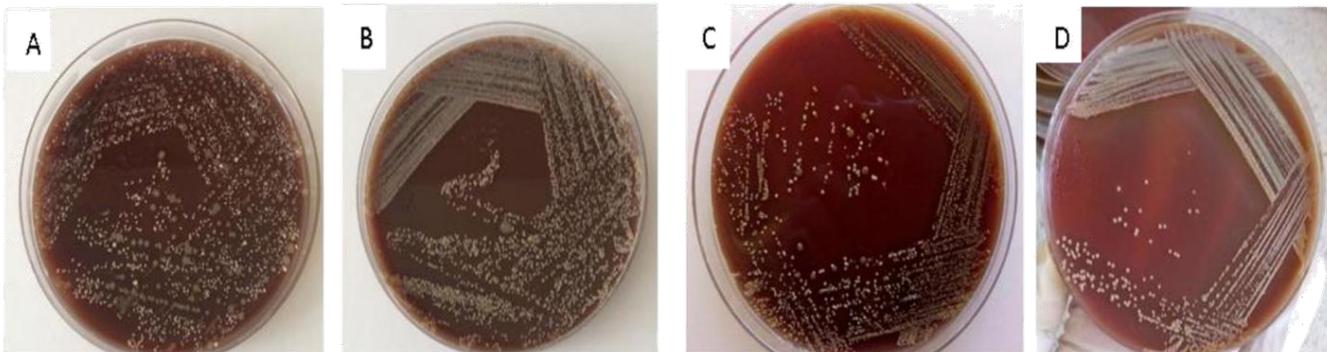
**Tabla 8. Resultados del crecimiento en el medio No .1, de muestras de comedones de la piel de la cara de pacientes voluntarios.**

MUESTRA	DESCRIPCIÓN MACROSCOPICA	DESCRIPCION MICROSCOPICA
Paciente 1 2017121401	Colonias pequeñas redondas de color blanco.	Bacilos Gram positivos
Paciente 2 2017121402	Colonias pequeñas redondas de color blanco.	Bacilos Gram positivos
Paciente 3 2017121403	Colonias pequeñas redondas de color blanco.	Bacilos Gram positivos
Paciente 4 2017121404	Colonias grandes redondas aplanadas cremosas.	Cocos Gram positivos
Paciente 5 2017121405	Colonias pequeñas redondas de color blanco.	Bacilos Gram positivos
Paciente 6 2017121406	Colonias pequeñas redondas de color blanco.	Bacilos Gram positivos
Paciente 7 2017121407	Colonias grandes redondas cremosas de color Habano	Cocos Gram positivos
Paciente 8 2017121408	Colonias pequeñas redondas puntiformes de color blanco.	Bacilos Gram positivos
Paciente 9 2017121409	Colonias pequeñas redondas puntiformes de color blanco.	Bacilos Gram positivos

Paciente 10 2017121410	Colonias pequeñas redondas puntiformes de color blanco.	Bacilos Gram positivos
---------------------------	---	------------------------

### ***Cultivo de muestras de comedón***

Las imágenes de la A-D de la Imagen 6, se muestran los resultados de los cultivos, a partir de la inoculación directa de las muestras de comedones de piel a los 5 días, se observan colonias de borde uniforme, de tamaño mediano, color crema, características de *C. acnes*; la imagen (A, B, C) muestran la recuperación de *C. acnes* y otros microorganismos presentes en piel de la muestra de comedón y la imagen (D) muestra el aislamiento de *C. acnes* de las muestras de Comedón.



**Imagen 6. Cultivos de muestras de comedón de pacientes en el medio de cultivo No 1.**

#### ***6.4.1. Identificación de Cutibacterium acnes en muestras clínicas.***

En la tabla 9 se puede observar la identificación de los microorganismos aislados a partir los comedones de pacientes voluntarios por BBL CRYSTAL Anaerobe, con sus respectivos códigos de identificación y el porcentaje de confiabilidad que se obtuvo. En la muestra 4 y 7 no fue posible recuperar a *C. acnes* y por identificación microscópica estas muestras mostraban morfología que correspondió a Cocos Gram positivos, por tal razón no se realizó identificación.

**Tabla 9. Identificación de *C. acnes* en muestras clínicas de pacientes voluntarios por pruebas bioquímicas con el sistema BBL CRYSTAL Anaerobe ID System.**

MUESTRA	Código de Identificación	MICROORGANISMO	Porcentaje de Identificación
1	1010070111	<i>Cutibacterium acnes</i>	96%
2	0030470010	<i>Cutibacterium acnes</i>	99%
3	1030470011	<i>Cutibacterium acnes</i>	99%
4	Cocos Gram positivos no identificados		-
5	0030470011	<i>Cutibacterium acnes</i>	94%
6	1010070111	<i>Cutibacterium acnes</i>	97%
7	Cocos Gram positivos no identificados		-
8	1010070111	<i>Cutibacterium acnes</i>	96%
9	0030470010	<i>Cutibacterium acnes</i>	99%
10	0010470111	<i>Cutibacterium acnes</i>	97%

La tabla 10 describe la recuperación de *C. acnes* donde 8 de las 10 muestras se aisló el *C. acnes* directamente en la placa de medio No1, por lo tanto, no fue necesario de realizar recuperación del microorganismo a partir del medio tioglicolato. En dos de las 10 muestras (4 y 7), al no ser recuperado el microorganismo en la placa de medio No1, se procedió a realizar el procedimiento en el caldo tioglicolato sin obtener resultados.

**Tabla 10. Recuperación de *C. acnes*, a partir de las muestras de pacientes, inoculadas en placa y caldo tioglicolato.**

MUESTRA	RECUPERACION DIRECTA EN PLACA	RECUPERACION DESDE EL CALDO
2017121401 2017121402 2017121403 2017121404	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
	<b>No Recuperado</b>	<b>No Recuperado.</b>
	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario

2017121405	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121406		
2017121407	<b>No recuperado</b>	<b>No Recuperado.</b>
2017121408		
	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121409	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario
2017121410	<i>Cutibacterium acnes</i>	No fue necesario

## 7. DISCUSIÓN

*Cutibacterium acnes*, hace parte de la microbiota normal de la piel, está asociado con la patogénesis del acné, y se ha visto implicado en patologías infecciosas clínicamente representativas [5], este microorganismo hidroliza los triglicéridos de la piel, logrando la disminución de pH lo que favorece su desarrollo [25]. Se considera que el 80% de la población mundial por lo menos ha tenido un episodio de acné y en su mayoría son individuos jóvenes. Para el control de esta patología es necesario el uso de antimicrobianos, pero su uso indiscriminado ha hecho que las cepas de *C. acnes* adquieran cada vez más resistencia a los antibióticos [12], debido a todo lo anterior es imprescindible su aislamiento microbiológico.

*C. acnes* es un microorganismo exigente para su crecimiento, es anaerobio estricto lo que hace que su aislamiento sea dispendioso; en la literatura no se establece una metodología específica para su cultivo; lo cual con lleva a una disminución en su aislamiento y en el conocimiento de su susceptibilidad antimicrobiana, llevando a fallas en el tratamiento [37].

El presente estudio estuvo enfocado en determinar la eficiencia de un medio de cultivo propuesto que permita optimizar la recuperación y aislamiento de *C. acnes*. El medio de cultivo propuesto tuvo en cuenta los requerimientos nutricionales que la bacteria necesita para su crecimiento como son los azúcares (glucosa), ácidos grasos, vitaminas, sales minerales y aminoácidos (triptófano, prolina, arginina, serina); de esta manera se definieron los siguientes componentes que conformaron los tres medios propuestos: Agar-agar como gelificante, que proporciona estructura al medio para el desarrollo del microorganismo, glucosa, como fuente de carbono, cloruro de sodio como fuente de cationes y aniones, extracto de levadura como fuente de aminoácidos y minerales, vitamina K necesaria para el transporte de electrones y factores de crecimiento en el

caso de la hemina para la expresión de algunas enzimas y protegerse de los productos tóxicos del oxígeno y sangre de cordero[38]. Adicional a éstos se integró en cada uno de los medios a probar diferentes componentes que pudieran suplementar o mejorar el desarrollo del microorganismo tales como: glicerol (medio No. 1), glicerol y peptona (Medio No.2) y vitamina K, tripticasa y tripona (Medio No.3).

*Cutibacterium acnes*, ha demostrado tener una alta actividad lipolítica en comparación con otros microorganismos [39]. Tessio Rebello et al, [40]; señalan que el glicerol está presente en pequeñas cantidades en la piel y estimula el crecimiento de *C.acnes*, utiliza el glicerol como fuente de carbono y utiliza vía fermentativa para producir ácidos grasos de cadena corta, los cuales a su vez controlan el crecimiento de otras bacterias que se encuentren en el entorno [41].

Lo anterior se correlaciona con los resultados obtenidos en el presente ensayo, puesto que el medio No.1, que contenía glicerol como componente de adición; se obtuvo un mejor crecimiento del microorganismo, presentó colonias y morfología microscópica características de *C. acnes*, en un tiempo de 5 días.

Por otro lado, el medio No.2, que contenía peptona y glicerol como componentes adicionales, demostró un crecimiento menor, en un tiempo de incubación más prolongado, dos días más en comparación al medio No.1, las colonias mostraron variación en la morfología macroscópica. Este hallazgo en los resultados no es fácil de explicar; aunque Muller M, et al [43], observaron disminución en la recuperación y del crecimiento de *C.acnes* utilizando peptona en el medio de cultivo como lo encontrado en el presente estudio, ellos utilizaron botellas de cultivo , Bact ALERT-FN (BioMérieux ) y LYTIC 9000 ( Becton Dickinson), las cuales están compuestas por: caldo tripticasa de soya más peptona, complementada con una fase sólida de agar Infusión cerebro

corazón y carbón activado utilizadas para hemocultivos de anaerobios; encontraron que entre las cepas no detectadas se incluía a *C.acnes*, la tasa de detección para Gram positivos anaerobios fue de 65,2%

No obstante, la peptona es un componente de alto valor nutricional en los medios de cultivo, no todas las bacterias tienen la capacidad de hidrolizarla [20]. Por otra parte la peptona de caseína utilizada en este estudio carece aminoácidos como la serina utilizada por *C.acnes*. Yang Yu y cols [40], demostraron recientemente que el proteoma secretado por *C.acnes* y el tiempo de los cultivos presenta variabilidad en diferentes medios de crecimiento, lo que está relacionado con la disponibilidad de nutrientes presentes en el medio, ya que evidenciaron mayor expresión de proteínas en el medio de cultivo que tenía una fuente de lípidos como suplemento.

El medio No. 3, contenía como complemento tripticasa, tripona y vitamina K, se pudo evidenciar el crecimiento óptimo hasta después de 10 días, sus colonias mostraron características diferentes a las descritas como típicas; en la microscopía se observaron bacilos más pequeños y delgados. Aunque el medio contaba con glucosa necesaria para la fase exponencial, y a su vez con vitamina K la cual promueve el transporte de electrones y síntesis de esfingolípidos; no se observó crecimiento adecuado; posiblemente por la ausencia de una fuente lipídica en el medio [40]. Karl Jan y cols [44], describe que *Cutibacterium acnes* alcanza la fase exponencial entre el quinto y séptimo día de incubación, aumentando su crecimiento aproximadamente a  $10^7$  UFC; con la utilización de medios de cultivo que proporcionen las condiciones semejantes al interior del folículo pilosebáceo.

En el presente estudio se evidenció, que lograr un equilibrio entre los componentes suministrados en el medio y la necesidad nutricional de la bacteria, es fundamental para obtener un buen aislamiento con morfología característica de la bacteria en corto tiempo. Con la adición del glicerol se logró optimizar el aislamiento de *C. acnes*.

No todos los microorganismos son capaces de hidrolizar el glicerol [35]; que el medio No.1 propuesto tenga esta fuente de lípidos, lo convierte una herramienta muy útil para utilizarlo en el aislamiento de muestras clínicas de patologías en las que se asocia *C. acnes*.

Los medios comerciales que se utilizan normalmente para el cultivo de anaerobios como *C. acnes*, no contienen una fuente de lípidos, lo cual puede ser un factor determinante para que el cultivo demore hasta 14 días en mostrar un crecimiento adecuado [41]. El crecimiento de *C. acnes* ha demostrado requerir de un tiempo estimado de 5-14 días aproximadamente así lo evidencia Kovich L, y cols [7], en su estudio, sugiriendo una incubación inicial en caldo tioglicolato al menos durante 14 días para detectar los verdaderos cultivos positivos y negativos.

Las bacterias expresan diferentes enzimas que fermentan sustratos de azúcar específicos, *C. acnes* es lactosa negativa, maltosa negativa, manitol negativo [45]; es importante tener en cuenta que la presencia de estos azúcares en el medio de cultivo puede influir directamente en un crecimiento bacteriano inadecuado; por ejemplo, Yanhan Wang, y cols [22], evidenciaron que la sacarosa en el medio de cultivo inhibe el crecimiento de *C. acnes*.

La recuperación de *C. acnes* en los individuos de este estudio fue muy satisfactoria con un 80% de aislamientos positivos como lo encontrado por el grupo del Instituto Dermatológico de Bogotá quienes encontraron un 88% en 147 muestras procesadas de individuos con acné [46]

En general *C. acnes* ha ganado cada vez más importancia debido a su papel oportunista en las infecciones de tejidos blandos, y su aumento en la resistencia a los antimicrobianos, en este estudio se proporciona una herramienta útil, como lo es un medio de cultivo con excelentes características microbiológicas al alcance de todos los laboratorios, que servirá al bacteriólogo en su quehacer y en consecuencia esto repercutirá en mejores aislamientos, pruebas de resistencia antibiótica y tratamiento médico.

## 8. CONCLUSIONES

Los diferentes estudios que han trabajado con *Cutibacterium acnes* señalan haber utilizado los medios de cultivo más comunes para anaerobios, alguno de estos son Brucella, Infusión cerebro corazón, Wilkins Chalgren, los cuales no poseen un fuente lipídica que beneficie el crecimiento de *C. acnes* . Recientemente se han hecho estudios con tecnología mucho más avanzada que permite analizar el comportamiento de *C. acnes* frente a los ácidos grasos presentes en la piel, donde se concluye que entre más se asemeje el medio de cultivo al nicho natural del microorganismo se tendrá un mayor rendimiento en cuanto al crecimiento del microorganismo.

El medio número 1 de los tres propuestos en el estudio, fue seleccionado por mostrar una mayor productividad frente a la cepa ATTC de *C. acnes*, por lo cual se probó también frente a 10 muestras clínicas, de las cuales en un 80%, se pudo recuperar a *C. acnes*. Con la adición del glicerol mejoro el aislamiento, se evidencio una reducción en el tiempo de incubación, a 5 días.

El diseño de este, puede ser una herramienta útil y de bajo costo para mejorar el proceso microbiológico de aislamiento y por ende ayudar en el diagnóstico y el tratamiento de la infección, de igual manera se minimizaría el reporte de cultivos negativos antes de 5 días de incubación.

Se recomienda seguir realizando estudios de tipo microbiológico que permita conocer a fondo el metabolismo de *C. acnes* y así poder elaborar un medio que sea selectivo y de alta reproductividad; de igual manera seguir ensayar el medio con un número de muestras más grande que sea representativa y ojalá de orígenes clínicos diferentes en las que se vea implicado *C. acnes*. *Cutibacterium acnes* describe como un microorganismo de crecimiento lento es por esto que en todo caso se debe dar un tiempo de incubación mayor a 5 días para evitar falsos negativos.

## ANEXOS

### ANEXO 1.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### ***DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE *Cutibacterium acnes* A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.***

Respetuosamente lo invitamos a participar en la investigación que se adelanta en el proyecto de grado a cargo de Paola Andrea Sánchez Diaz y Leidy Katherine Sepúlveda Cubillos, estudiantes de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; el estudio pretende proponer un medio de cultivo como una posible herramienta que sea útil para optimizar el aislamiento y posterior identificación de *Cutibacterium acnes* siendo esta una bacteria que contribuye al desarrollo del acné.

Su participación consiste en proporcionar una muestra de alguna (as) de las lesiones producidas por el acné. Para su obtención se utilizará un instrumento metálico “extractor de comedones”, se ejercerá presión sobre el contorno de la lesión de acné hasta que brote la materia blanca. Puede presentar algunos efectos secundarios menores, como: enrojecimiento y dolor leve; la duración aproximada de este procedimiento es de 3-5 minutos.

Los resultados obtenidos serán consignados como información para ser analizada con fines exclusivamente académicos. Se garantiza total confidencialidad en el manejo de los datos, por lo cual no pondrá en evidencia el número de su documento de identidad, su nombre o aquella información que permita la identificación del participante.

Por las características de este proyecto se trata de una INVESTIGACIÓN CON RIESGO MINIMO (RESOLUCIÓN 8430 DE 1983).

Con su participación usted contribuye de forma importante a profundizar en el conocimiento de *Cutibacterium acnes*. Su participación es completamente voluntaria.

Yo, \_\_\_\_\_ Identificado (a) con \_\_\_\_\_

N. ° \_\_\_\_\_ He leído y acepto que la muestra se ha utilizada en la investigación.

FIRMA: \_\_\_\_\_

## PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Componentes por litro de medio					
Medio No.1		Medio No. 2		Medio No.3	
Agar-agar	16g	Agar-agar	16g	Tripticasa soya agar	16g
Extracto de levadura	5.5g	Extracto de levadura	5.5g	Triptona	5.5 g
Glucosa	1.1g	Glucosa	1.1g	Extracto de levadura	5.5 g
Cloruro de Sodio	5.5g	Peptona de caseína	11g	Cloruro de sodio	5.5 g
Hemina	0.005g	Cloruro de Sodio	5.5g	Hemina	0.005g
Glicerol	11ml	Hemina	0.005g	Vitamina K	0.1ml
Sangre de cordero	5%	Glicerol	11ml	Sangre de cordero	5%
		Sangre de cordero	5%		
Ajustados a pH: 7.1					

### Procedimiento

1. Pesar los componentes del medio.
2. Con ayuda de una probeta medir la cantidad de agua requerida, teniendo en cuenta la cantidad de sangre que será adicionada (1000ml de medio, 5% sangre de cordero: 950ml de agua y 50ml de sangre de cordero)
3. Adicionar los componentes al agua, Calentar y agitar.
4. Esterilizar en autoclave.
5. Enfriar y adicionar demás componentes como la sangre y la hemina.
6. Servir placas.

Los medios de cultivo fueron preparados por producción manual y los diferentes componentes fueron agregados por separado en cada uno de los medios, para los tres medios se agregaron los componentes

base previamente pesados como el agar, el extracto de levadura, glucosa, cloruro de sodio, peptona, tripticasa, el glicerol junto con el agua desmineralizada en un Erlenmeyer, se lleva a calentamiento y agitación hasta ebullición; los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 30 minutos de 15-18 Psi. Luego de ser esterilizados se agregaron en cabina de flujo componentes como Hemina y sangre de cordero desfibrinada al medio en una temperatura entre 50 – 52°C, por agitación se mezclan con el medio y posteriormente es servido en placas de Petri a una temperatura de servido de 47°C.



*Fuente: Autoras.*

## REFERENCIAS

1. Dow R, et al. Laboratory Methods in Anaerobic bacteriology CDC laboratory manual. public health service centers for disease control atlanta, georgia 30333[Internet].2015. [citado 6 abril 2017], disponible en : [https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7666/cdc\\_7666\\_DS1](https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7666/cdc_7666_DS1)
2. Wilkins T, Chalgren S. Medium for Use in Antibiotic Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1976;10(6):926-928.
3. Brazier J, Goldstein E, Citron D, Ostovari M. Fastidious anaerobe agar compared with Wilkins-Chalgren agar, brain heart infusion agar, and brucella agar for susceptibility testing of *Fusobacterium* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990;34(11):2280-2282
4. Capoor M, Ruzicka F, Machackova T, Jancalek R, Smrcka M, Schmitz J et al. Prevalence of *Propionibacterium acnes* in Intervertebral Discs of Patients Undergoing Lumbar Microdiscectomy: A Prospective Cross-Sectional Study. *PLOS ONE*. 2016;11(8):e0161676.
5. Lavergne V, Malo M, et al. Clinical impact of positive *Propionibacterium acnes* cultures in orthopedic surgery. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. 2017,103 :307– 314. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otsr.2016.12.005>
6. Butler-Wu S, Burns E, Pottinger P, Magaret A, Rakeman J, Matsen F et al. Optimization of Periprosthetic Culture for Diagnosis of *Propionibacterium acnes* Prosthetic Joint Infection. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2011 [cited 10 February 2017];49(7):2490 - 2495.disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147880/>
7. Kvich L, et al. Incidence of *Propionibacterium acnes* in initially culture-negative thioglycollate broths a prospective cohort study at a Danish University Hospital. *Rev Clinical Microbiology and Infection*.2016,22:941-945.disponible en <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.036>
8. Pulverer G, H. L. KO. Fermentative and Serological Studies on

*Propionibacterium acnes*. APPLIED MICROBIOLOGY. 1973;25(2).

9. Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. [Internet]. Aem.asm.org. 1979 [cited 10 March 2017]. Available from: <http://aem.asm.org/content/38/4/585.short>
10. Kishishita M, Ushijima T y et al. New Medium for Isolating *Propionibacteria* and Its Application to Assay of Normal Flora of Human Facial Skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980,40:1100-1105
11. Roe D, Finegold S, Citron D, Goldstein E, Wexler H, Rosenblatt J et al. Multilaboratory Comparison of Growth Characteristics for Anaerobes, Using 5 Different Agar Media. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;35(s1):S36-S39z
12. Mendoza N, Hernandez P, et al. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. *International Journal of Dermatology* 2013, 52: 688–692
13. Noble W, *The skin microflora and microbial skin disease* Cambridge University Press 1933, 390pp, editorial 2004. Disponible en: <https://books.google.com.co/books>
14. Perr A, Lambert A. *Propionibacterium acnes*. Journal compilation . The Society for Applied Microbiology, *Letters in Applied Microbiology* 42 (2006) 185–188. disponible en: doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01866.
15. Kishishita M,Ushijima T,Ozaki Y,Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* Isolated from Normal Human Facial Skin. *Environmental Microbiology*, oct. 1979, p. 585-589.
16. Avilés E. Caracterización Bioquímica y Susceptibilidad a Antimicrobianos de Cepas *Propionibacterium Acnés* Aisladas de Personas con Acné. Universidad de Chile (pregrado). Santiago de Chile 2010
17. Csukas, Z., Banizs, B. and Rozgonyi, F. (2004) Studies on the cytotoxic effects of *Propionibacterium acnes* strains isolated from cornea. *Microb Pathog* 36, 171–174
18. Cove, Holland, K.T. and Cunliffe, W.J. (1983) Effects of oxygen concentration on biomass production, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous *propionibacteria* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 129, 3327–3334.

19. Yang Yu, Champer J, Kim J, Analysis of the surface, secreted, and intracellular proteome of *Propionibacterium acnes*, *EuPA Open Proteomics*, Volume 9, 2015, Paginas 1-7, disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2015.06.003>
20. L Constanza, D Romero, J Bohórquez , M Corredor. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de vida en el planeta. *Nova* [Internet]. 2015 July [cited 2018 May 08] ; 13( 24 ): 55-81.
21. Brzuszkiewicz E, Weiner J, et al. (2011) Comparative Genomics and Transcriptomics of *Propionibacterium acnes*. *PLoS ONE* 6(6): e21581. Disponible en: [doi:10.1371/journal.pone.0021581](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021581).
22. Y wang , m shan kao , j yu, et al. A precision microbiome approach 23. using sucrose for selective augmentation of *staphylococcus epidermidis* fermentation against *propionibacterium acnes*. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1870; disponible en: [doi: 10.3390/ijms17111870](https://doi.org/10.3390/ijms17111870)
24. G Varela, G Grotiuz . fisiologia y metabolism bacateriano - Uruguay, Editorial Cefa, 2008 - [higiene.edu.uy](http://higiene.edu.uy)
25. Achermann , Goldstein E, et al. *Propionibacterium acnes*: del patógeno de implante asociado a biofilm Comensal al oportunista. *Clinical Microbiology Reviews*,21014. Disponible en: [10.1128 / CMR.00092-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00092-13)
26. Dessinioti C, Katsambas A. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clinics in Dermatology* [Internet]. 2010 [cited 4 April 2017];28(1):2-7. Available from: <http://10.1016/j.clindermatol.2009.03.012>
27. Kumar B, Pathak R. Nuevas ideas sobre la patogénesis del acné: Explorando el papel de las poblaciones microbianas al acné. *ScienceDirect*. 2017; 34: 67 – 73.
28. Germán Bou, Ana F, et al. Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:601-8 - DOI: [10.1016/j.eimc.2011.03.012](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012)
29. Miguel G, Hontangas L. Bacterial identification methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21 Supl 2:54-60
30. Mahto A. Acné común. *ScienceDirect*. 2017; 48: 386 – 389
31. Mahto A. Acné vulgar. *ScienceDirect*. 2017; 45 (6): 386 – 389

32. Shalita A. Acne: Clinical presentations. Clin Dermatol n.d;22:385-6.
33. Beylot C , Auffret N, et al. *Propionibacterium acnes* : an update on its role in the pathogenesis of acne. J Eur Acad Dermatol Venereol 2014;28:271-8
34. K.Wolff, R. Allen, A. Savedra. Atlas de Dermatología Clínica 7e. Editorial McGrawHill. ISBN :978-0-07-179302-5.
35. Prats G.Microbiología Clínica. 1ªed.Buenos Aires.Panamericana;2005
36. Panreac química. Manual básico de microbiología.Cultimed;2003.disponible en [https://issuu.com/sardilacc/docs/panreac\\_-\\_manual\\_microbiologia\\_2003/143](https://issuu.com/sardilacc/docs/panreac_-_manual_microbiologia_2003/143)
37. Portillo, Eugenia M, et al. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. Journal of infection. Volumen 69:35-41.
38. Aubin GG et al. Propionibacterium acnes, an emerging pathogen: from acne to implantinfections, from phylotype to resistance. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2014 [cited 3 May 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656842>.
39. Hechos Microbiol. 2013; 4(1); 56-60. © 2013 por la Universidad de Antioquia 40. Puhvel M, Reisner R, Sakamoto M. Analysis of lipid composition of isolated human sebaceous gland homogenates after incubation with cutaneous bacteria. Thin-layer chromatography . The Journal of Investigative Dermatology, 64:406-411, 1975, disponible en:
41. T. Rebello , J Lyndon . Skin Surface Glycerol Levels in Acne Vulgaris. The Journal of Investigative Dermatology, 70:352-354,1978. Disponible en : 10.1111/1523-1747.ep12543549
42. Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S,et al . Fermentación de *Propionibacterium acnes*, una bacteria comensales en el microbioma de la piel humana, como probióticos de la piel contra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina . PLoS ONE 8 e55380,2013. Disponible en : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055380>
43. M Mueller, S Jeverica, L Papst, E Nagy,Performance of two blood culture systems to detect anaerobic bacteria. Is there any difference?. Anaerobe, Volume 45, 2017, Pages 59-64, disponible en : CBV<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.006>.
44. Karl J, Tom C. Developing an in vitro artificial sebum model to study, Propionibacterium acnes biofilms, Anaerobe, Volume 49, 2018, Paginas 21-29, disponible :

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.11.002>

45. M Nakamura, I Kametani, S Higaki, T Yamagishi. Identification of *Propionibacterium acnes* by polymerase chain reaction for amplification of 16S ribosomal RNA and lipase genes. *Anaerobe*, Volume 9, Issue 1, 2003, Pag 5-10, disponible en : [https://doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00061-1)

46. Entrevista, Proyecto Susceptibilidad antimicrobiana *C. acnes*; Instituto dermatológico Federico Ileras Acosta, Universidad Nacional; Diciembre 2017.