

CARACTERIZACIÓN DE *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* AISLADO A PARTIR DE ACNÉ VULGARIS

Catalina Ibañez Galvis

Asesora interna

DRA. MARCELA GÓMEZ GARZÓN. MSc.

Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

Asesora externa

DRA. LILIAN TORRES TOBAR. MSc.

Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud



FUCS



A dark blue arrow points to the right from the left edge of the slide. Below it, several thin, curved lines in shades of blue and grey sweep across the left side of the page.

Contenido

1. Marco teórico
2. Problema de investigación
3. Objetivos
4. Metodología
5. Resultados y discusión
6. Conclusiones
7. Recomendaciones
8. Referencias



Marco Teórico

Acné vulgar

Marco teórico

85%

de los jóvenes
entre 12 y 25
años (1)

US \$ 3.000.0000

50%

muestran respuesta al
tratamiento

11%

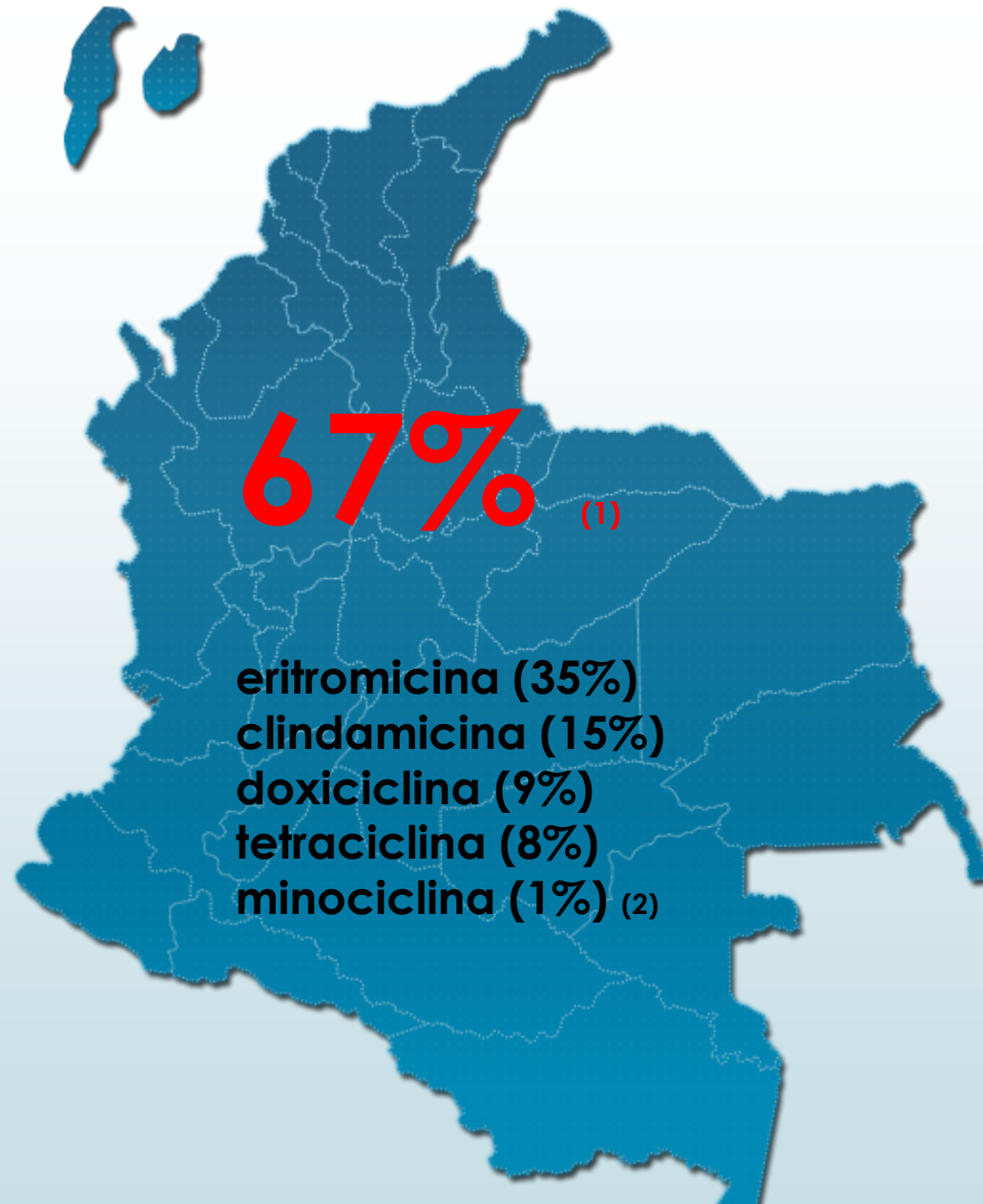
de mujeres
presentan
depresión.

- Entre las **10** enfermedades más prevalente del mundo.
- Entre las **3** enfermedades cutáneas mas comunes.

Acné vulgar

Marco teórico

SERVICIO DERMATOLOGIA
Fundación Sociedad de
Cirugía de Bogotá, Hospital
San José BOGOTÁ
2012 a 2017: 1697 Pacientes⁽³⁾



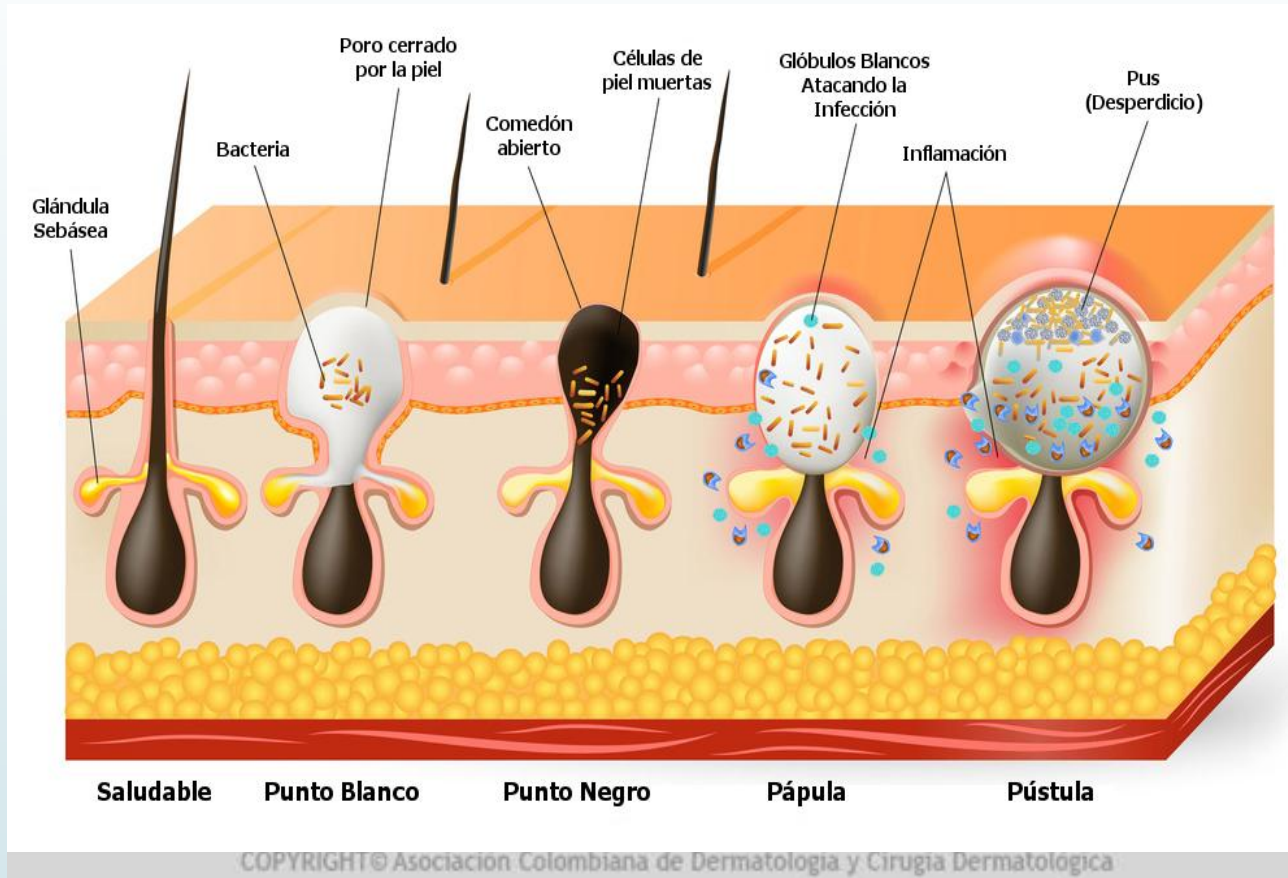
1. Cardona y col. 2014. "Prevalencia de acné en estudiantes de octavo a undécimo grado de El Retiro-Antioquia y percepciones asociadas"

2. Mendoza *et.al* 2013 "Antimicrobial susceptibility of Propionibacterium acnes isolates from acne patients in Colombia".

3. Servicio Dermatología; Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá. Hospital San José, Bogotá; 2012-2017

Acné vulgar

Marco teórico



Hiperqueratinización
folicular

Función hormonal alterada

Aumento en la
producción de sebo

Proliferación de *C.acnes* (1)

Clasificación del acné

Clasificación según el grado de severidad Consenso Ibero-Latinoamericano, 2014 (1)

Marco teórico

Leve



Moderado.



Severo.



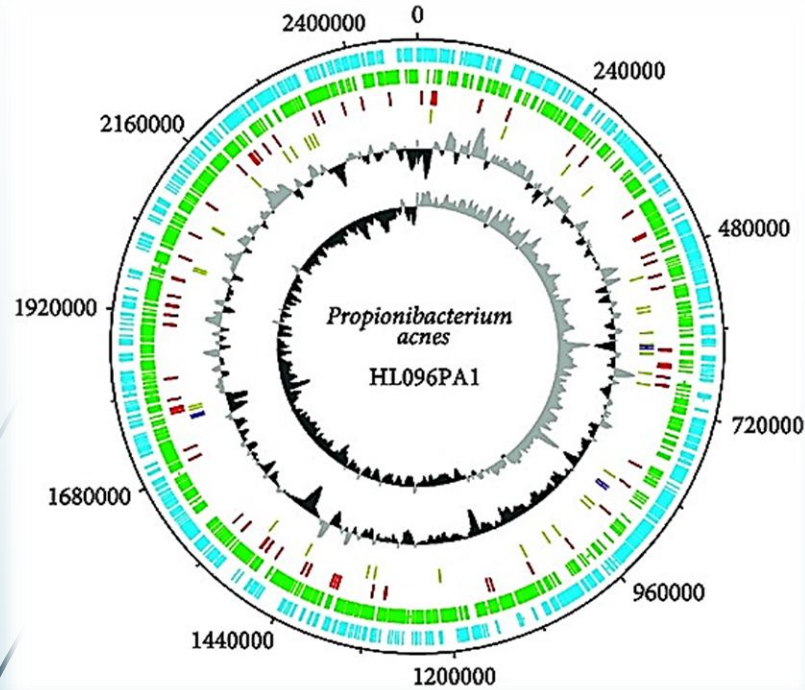
Tomadas por el grupo de Dermatología de la Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José(2).

1. Kaminsky A, Florez-White M, Arias MI, Bagatin E. Clasificación del acné: Consenso Ibero-Latinoamericano, 2014.

2. Servicio Dermatología; Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá. Hospital San José, Bogotá; 2012-2017

Cutibacterium acnes

Marco teórico



Tomado de: Kasimatis *et.al*, 2013

- Plásmidos con Tad, Sad y CRISPR(1).
- ~ 2560 Kpb(2).
- 2416 genes codificantes (3).
- Genes que codifican:
 - ❖ citocromos y atpD.
 - ❖ Nitrato reductasa, reductasa de dimetil sulfóxido y fumarato reductasa.
 - ❖ Triacilglicerol lipasa, sialidasa, hialurinatoliasa, varias peptidasas extracelulares y cinco genes homólogos que codifican factor CAMP(3).

1. Fitz-Gibbon S, *et al*. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. 2013.
2. Kasimatis *et.al* Analysis of Complete Genomes of *Propionibacterium acnes* Reveals a Novel Plasmid and Increased Pseudogenes in an Acne Associated Strain. 2013.
3. Brüggemann H, *et.al* . The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. 2004

Clasificación de *C. acnes*

Marco teórico

01

Biotipo

- 1979: **Kishishita *et al*** (1)
- Capacidad de fermentar los carbohidratos eritritol, sorbitol y ribosa.
- Existen 5 biotipos (B1 al B5)

02

Ribotipo

- 2013: **Gibbon *et. al*** (3)
- Consiste en la secuencia de DNA ribosomal 16S
- Existen más de 10 ribotipos

03

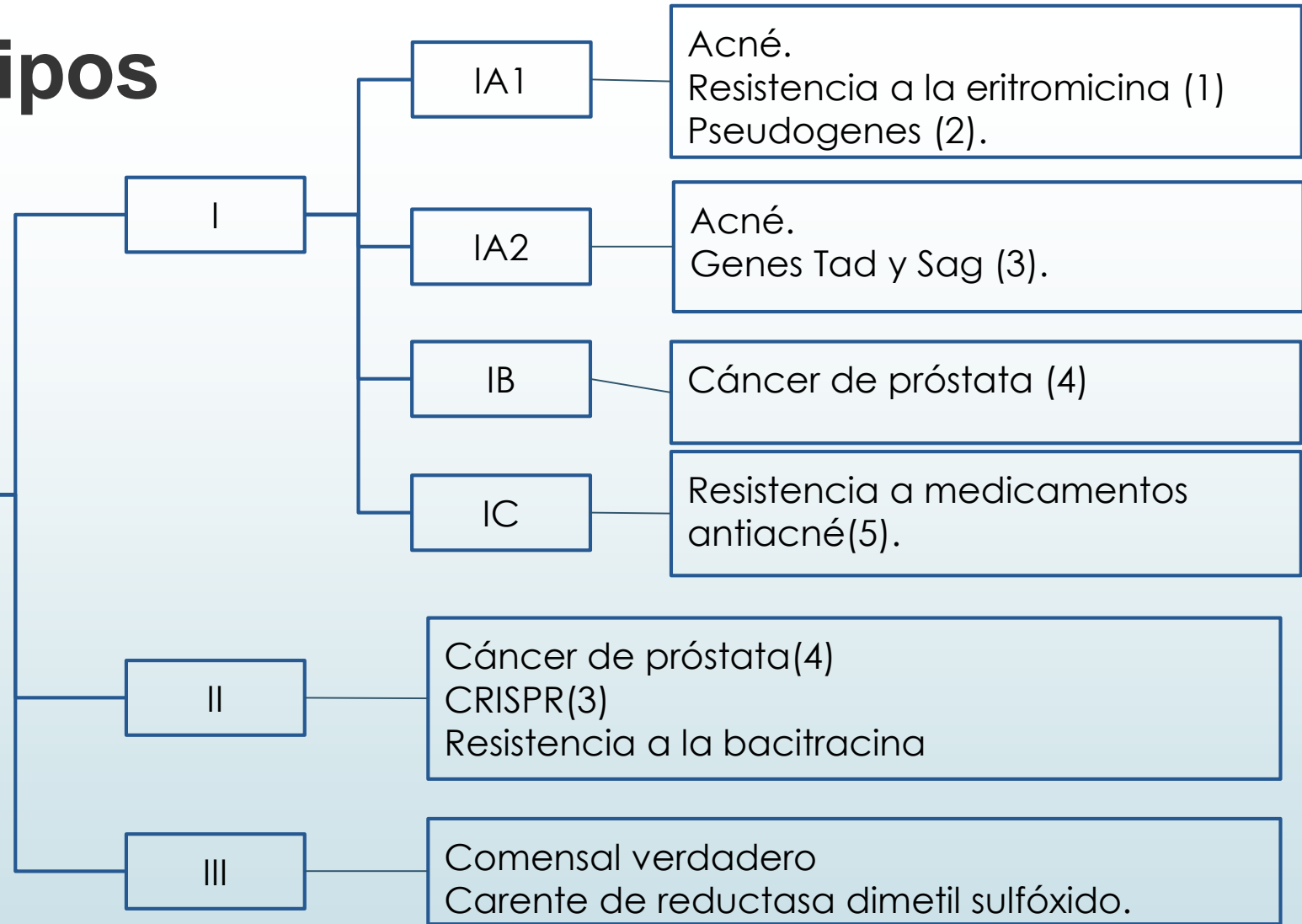
Filotipo

- 2005: **Mc Dowell *et.al*** (2)
- Consiste en la secuencia de ADN de múltiples genes.
- En la actualidad existen 5 filotipos (IA1,IA2,IB,IC,II,III)

1. Kishishita, M., Ushijima, T., Ozaki, Y., & Ito, Y. (1979). Biotyping of Propionibacterium acnes isolated from normal human facial skin.
2. McDowell A; et al. Propionibacterium acnes types I and II represent phylogenetically distinct groups. Journal of clinical microbiology. 2005.
3. Fitz-Gibbon S et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. 2013.

Filotipos

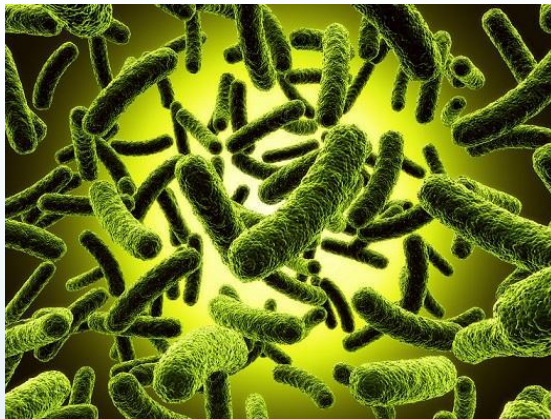
C.acnes



1. Aubin et.al 2016 "Draft Genome Sequences of Four Propionibacterium acnes Strains Isolated from Implant-Related Infections
2. Kasimatis et.al Analysis of Complete Genomes of Propionibacterium acnes Reveals a Novel Plasmid and Increased Pseudogenes in an Acne Associated Strain. 2013.
3. Fitz-Gibbon S et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. 2013.
4. Shannon BA, Cohen RJ, Garrett KL. Polymerase chain reaction-based identification of Propionibacterium acnes types isolated from the male urinary tract: evaluation of adolescents, normal adults and men with prostatic pathology



PREGUNTA DE INVESTIGACION.



¿Cuáles son los biotipos y filotipos de cepas de *C. acnes* aislados a partir de lesiones patognomónicas de acné mediante la utilización de técnicas bioquímicas y moleculares?



OBJETIVOS

General

Objetivos

Caracterizar las cepas de *C. acnes* aisladas a partir de pacientes con acné que consultaron al servicio de Dermatología de la Fundación Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital San José en el año 2016, por medio de técnicas moleculares y bioquímicas.

Específicos

- Estandarizar la reacción en cadena polimerasa específica para cada uno de los filotipos de *C. acnes*
- Realizar la filotipificación de *C. acnes* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.
- Realizar la biotipificación de *C. acnes*, mediante pruebas de fermentación de azúcares.
- Analizar los resultados obtenidos de los filotipos y biotipos en cepas de *C. acnes*.



METODOLOGÍA

Antecedentes

Metodología

DETERMINACIÓN DE FILOTIPOS DE
Propionibacterium acnes POR

MALDI-TOF

(1)

90 pacientes

- 57 bacilos Gram positivos
- 53 cocos Gram positivos

MALDI-TOF

33 *C. acnes*

7 *C. avidium*

12 *P. acidifaciens*

Biotipificación

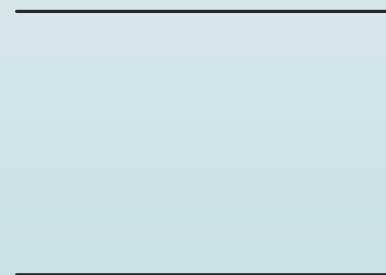
Metodología



Biotipo	Ribosa	Eritritol	Sorbitol
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	-	-



Cepas en medio Schaedler



Fermentación del carbohidrato



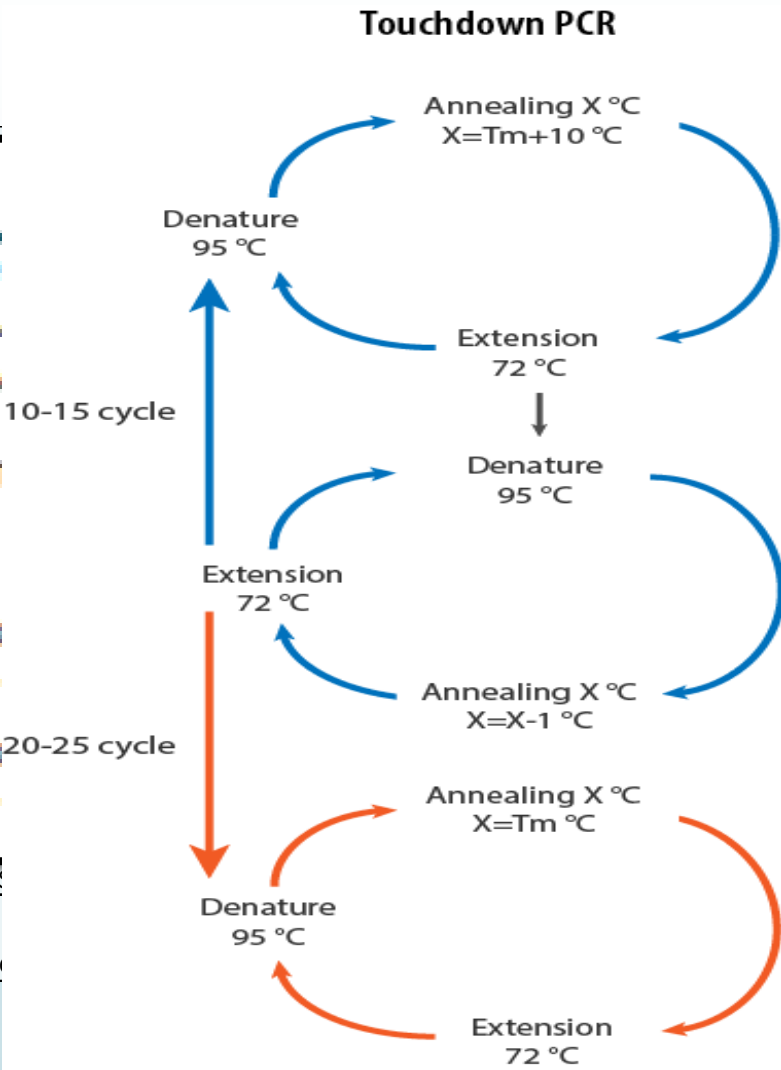
No fermentación del carbohidrato.

1. Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of Propionibacterium acnes isolated from normal human facial skin.

Filotipificación

Metodología

Primer	sodA (PAMp 3 y 4)	
	Seque	
PArA	Forward primer	CGGA
	Reverse primer	GAAG
PArA	> HQ283918.1 Propionibacterium	
PAMp	product length = 145	
PAMp	Forward primer 1	CGGAACCATA
PAMp	Template	80
PAMp	Reverse primer 1	GAAGAACTA
PAMp	Template	224
PAMp 8		Sintesi
PAMp 9	RecA	
PAMp 10		Protege



- Concentración de ADN
- Presencia de inhibidores
- Temperatura de anillamiento

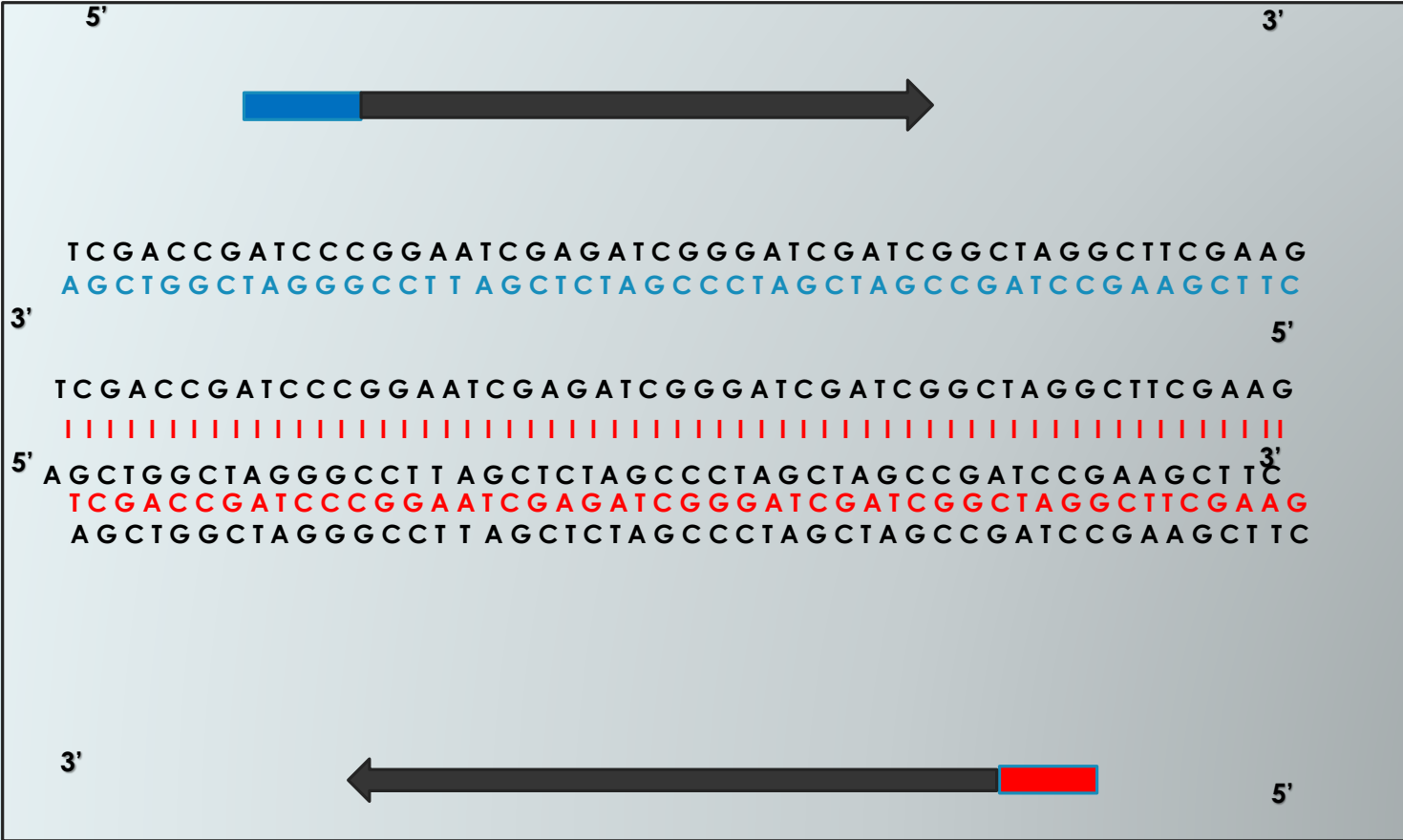
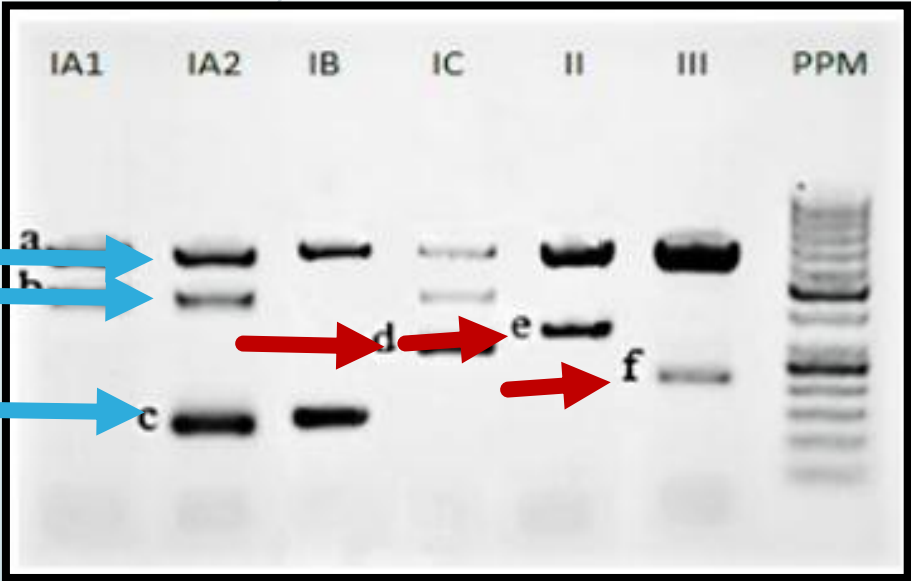
Estandarización de la PCR

1. Barnard *et.al* . Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen Propionibacterium acnes.2015
2. https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_variation_system.php

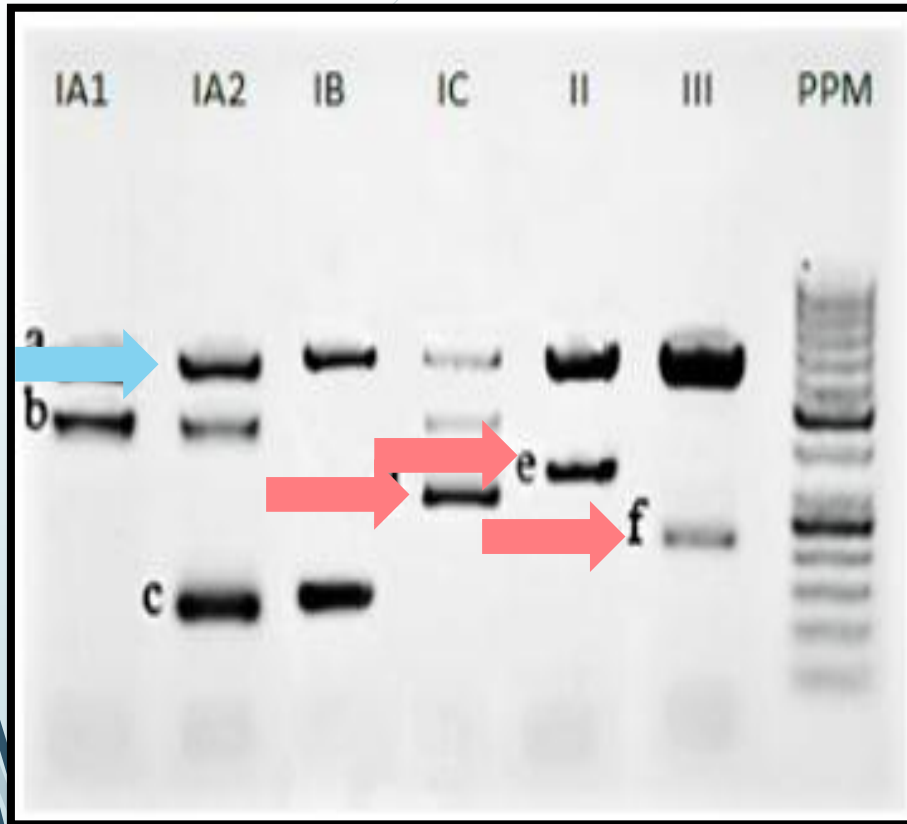
Diseño de sondas

Metodología

CEPA ATCC 6919 (IA2)



DISEÑO DE SONDAS



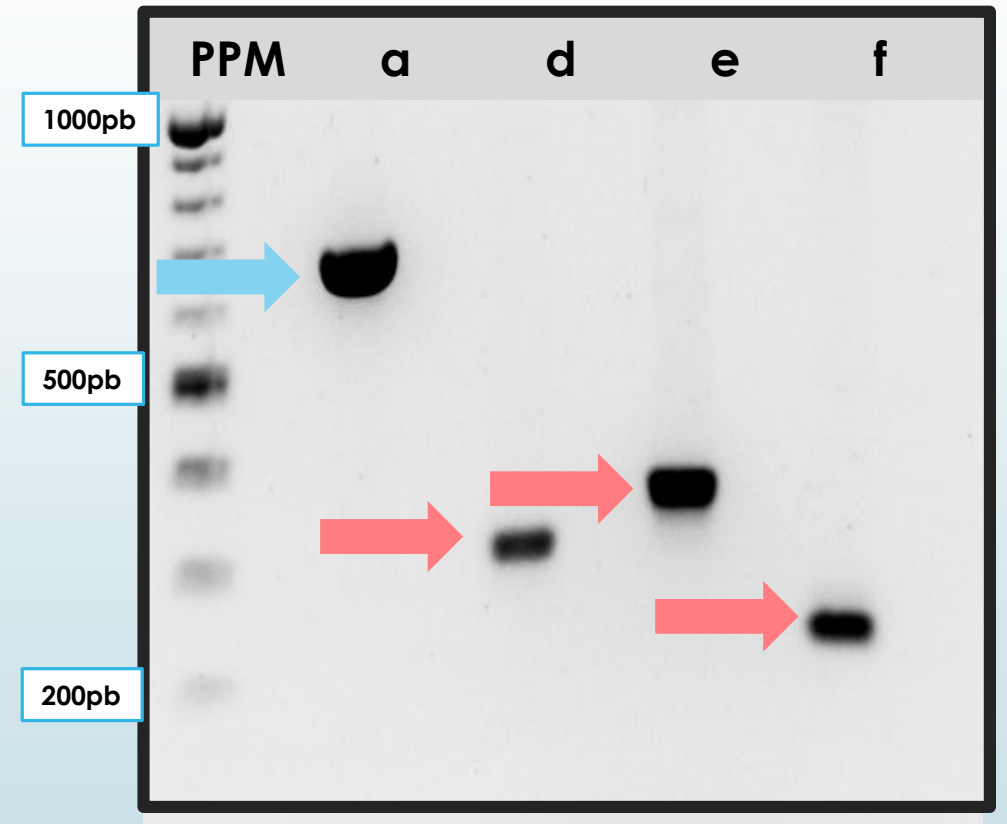
a. RNAr 16S

d. Toxina de la familia FIC

e. atpD

f. Rec A

Fuente: Barnard et.al 2015

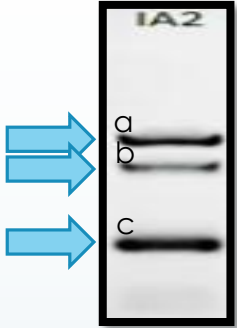


Fuente: Ibañez et.al 2018

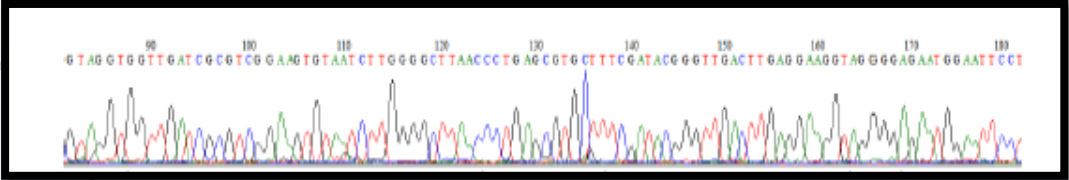
Secuenciación

Metodología

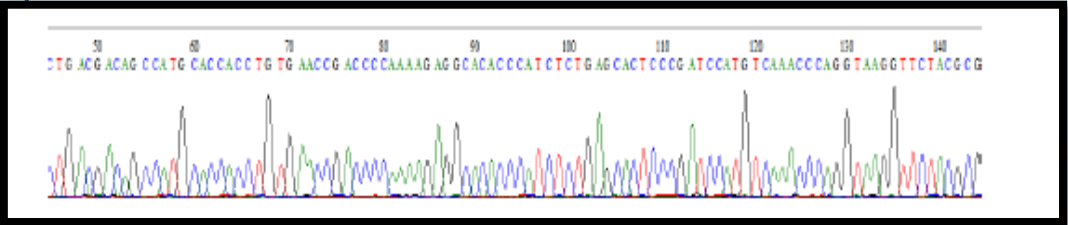
Fragmento amplificado del RNAr 16s



PArA1



PArA 2



Fuente: Ibañez et.al 2018 Programa bioinformático BioEdit

Propionibacterium acnes subsp. acnes strain HKG 282 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KY974870.1](#) Length: 1211 Number of Matches: 1

Range 1: 417 to 831 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	736 bits(398)	0.0	410/415(99%)	4/415(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTGATACGTAGGGTGGGAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGT-AAGGGCTCGTAGGTGGT				59
Sbjct 417	GTGATACGTAGGGTGGGAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGTGGT				476
Query 68	TGATCGCGTCGGAAAGTGAATCTTGGGGCTTAACCCGAGCGTGTCTTTCGATACGGGTTG				119
Sbjct 477	TGATCGCGTCGGAAAGTGAATCTTGGGGCTTAACCCGAGCGTGTCTTTCGATACGGGTTG				536
Query 120	ACTTGAGGAAGGTAGGGGAAATGGAAATTCCTGGTGGAGCGGTGGAAATGGCAGATATCA				179
Sbjct 537	ACTTGAGGAAGGTAGGGGAAATGGAAATTCCTGGTGGAGCGGTGGAAATGGCAGATATCA				596
Query 180	GGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCTTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAG				239
Sbjct 597	GGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCTTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAG				656
Query 240	CGTGGGAGCGAACAGGCTTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGGG-GGGTACTA				298
Sbjct 657	CGTGGGAGCGAACAGGCTTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGGGTTGGGACTA				716
Query 299	GGTGTGGGGTCCATTCACGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGCCTGG				358
Sbjct 717	GGTGTGGGGTCCATTCACGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGCCTGG				776
Query 359	GGATACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAGAG-AATTGAC-GGGCCCCGCAAGCG				411
Sbjct 777	GGATACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAGAGGAATTGACGGGGCCCCGCAAGCG				831

Fuente: Ibañez et.al 2018 Análisis Bioinformática en BLAST

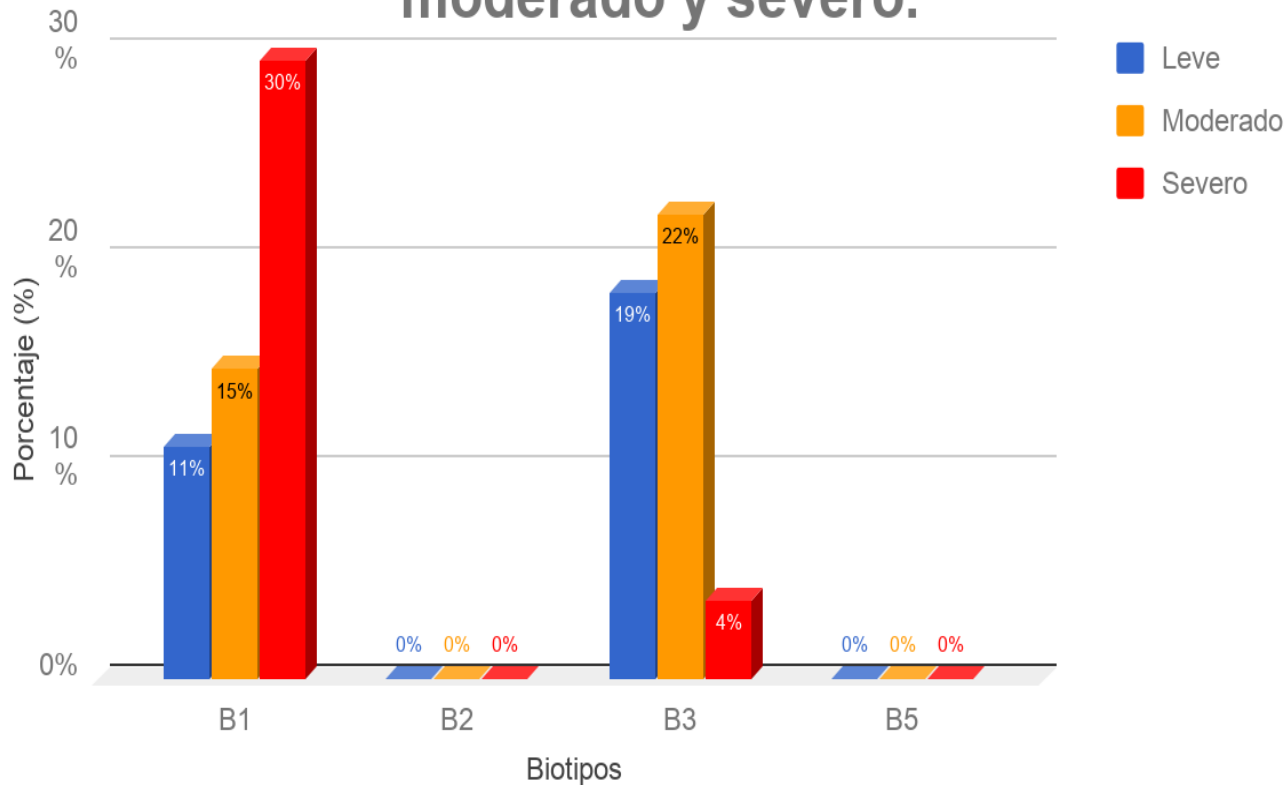


Resultados y discusión

Biotipos y acné vulgar

Resultados y
discusión

Biotipos de *C. acnes* encontrados en acné, leve moderado y severo.



España (1)
58.33%- B3
12.5%- B1
8.33%- B2 y
B4

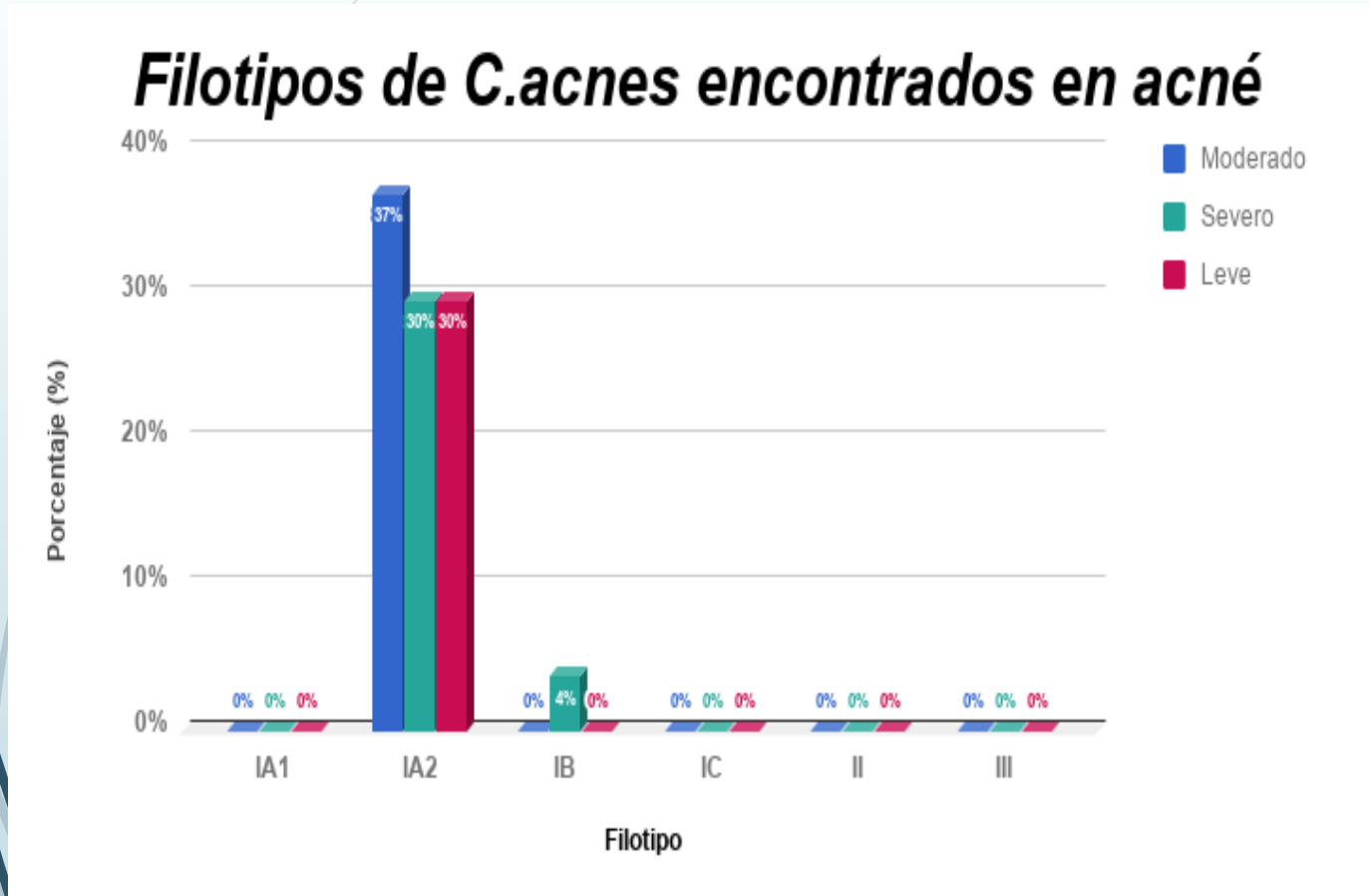
Japón (2)
52%-B3
21%-B1
17%-B2

Colombia
(15) 56%-B1
(12)44%-B3

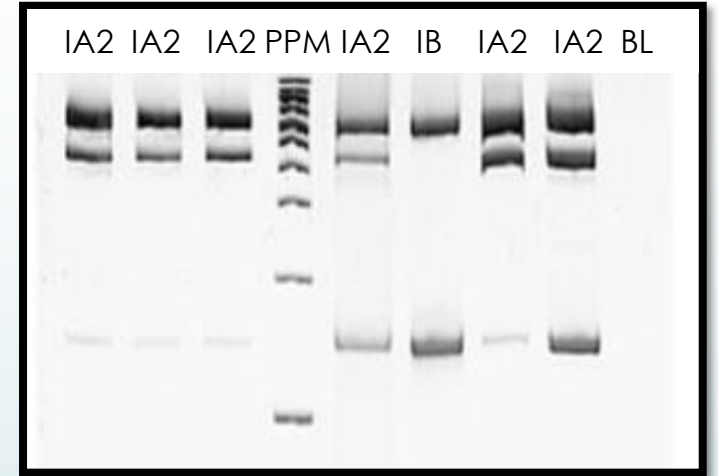
Fuente: Ibañez et.al 2018

1. Cebrián R, *et. al* Optimization of genotypic and biochemical methods to profile *P. acnes* isolates from a patient population.2017.
2. Higaki S, *et.al*. Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. 2000 A

Filotipos y acne vulgar



Fuente: Ibañez et.al 2018



Fuente: Ibañez et.al 2018

	Mc Dowell et.al 2012	Paugam et.al 2017 (Francia)	Ibañez et al. 2018
IA1	74%	62%	0%
IA2	9%	1,6%	96%
IB	6%	4,8%	4%
IC	4%	0%	0%
II	8%	14,3	0%

Tipificación de *C. acnes* por diferentes técnicas.

CEPA	FILOTIPO MALDITOF	FILOTIPO PCR-TDm	BIOTIPO
ATCC	IA2	IA2	III
3	IB	IA2	I
16	IA2	IB	I
18	IA1	IA2	I
19	II	IA2	I
25	IA1	IA2	III
30	IA2	IA2	III
37	IA2	IA2	III
ATCC	38	IA2	III
	40	IA2	III
	42	IA2	III
3	45	IA2	III
16	46	IA2	III
	50	IA2	III
	51	IA2	I
18	54	IA2	III
	57	IA2	I
19	59	IA2	I
	60	IA2	I
25	83	IA2	III
	80	IA2	I
30	90	IA2	I
	72	IA2	
37	81	IA2	I
	88	IA2	I
	39	IA2	III
	64	IA2	I
	71	IA2	I

86,4% de discriminación para genero
80% de identificación para especie
 Dekio *et. al* 2013 (Japón).

Conclusiones

- La filotipificación de *C. acnes* es posible por medio de la PCR TD multiple aquí realizada, con el fin de conocer los filotipos en nuestra población y su asociación con la evolución del acné.
- En la población estudiada el filotipo mas frecuente fue el IA2
- La biotipificación es un método fácil de realizar sin embargo su costo y el difícil acceso a los carbohidratos limitan tu utilización.
- La biotipificación en la actualidad no constituye una herramienta útil para e diagnostico, tratamiento o seguimiento del acne.
- Las características proteómicas pueden variar según el perfil de expresión, dificultando la identificación correcta por MALDI TOF .
- Se pueden presentar diferentes filotipos de acuerdo a las características de la población.

Recomendaciones

- ▶ Para conocer la frecuencia de cada uno de los filotipos circulantes en Colombia se debe hacer un estudio poblacional mayor.
- ▶ Analizar otro tipo de patologías en las que esta involucrado *C. acnes*, daría una mejor comprensión del papel del microorganismo sobre estas.
- ▶ Analizar plásmidos y genes que confieren virulencia y resistencia antimicrobiana en las cepas de *C. acnes* circulantes en Colombia.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Fundación
Universitaria de Ciencias de la Salud FUCS



Agradecimientos

- A la fundación Universitaria de Ciencias de la Salud FUCS.
- A la Dra. Lilian Torres Tobar y a la Dra. Marcela Gomez.
- A los docentes y funcionarios de la fundación Universitaria de Ciencias de la Salud FUCS.
 - A mi familia.

Referencias

- Mendoza N, Hernandez PO, Tying SK, Haitz KA, Motta A. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. *International journal of dermatology*. 2013;52(6):688-92. Epub 2013/03/05.
- Barnard E, Nagy I, Hunyadkurti J, Patrick S, McDowell A. Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(4):1149-55. Epub 2015/01/30.
- McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC, et al. *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(1):326-34. Epub 2005/01/07.
- Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH, Nguyen L, Du C, Liu M, et al. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(9):2152-60. Epub 2013/01/23.
- Lomholt HB, Kilian M. Clonality and anatomic distribution on the skin of antibiotic resistant and sensitive *Propionibacterium acnes*. *Acta dermato-venereologica*. 2014;94(5):534- Epub 2014/03/01.
- <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2920s/20.html>.
- Quintero Y, Asuaje L, Franco F, Roye R. *Propionibacterium acnes*: pasado, presente y futuro. *Dermatología Venezolana*. 2015; 53(2).
- *ssssug*; 27(8):519–22.
- Perkins AC, Cheng CE, Hillebrand GG, Miyamoto K, Kimball AB. Comparison of the epidemiology of acne vulgaris among Caucasian, Asian, Continental Indian and African American women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 Sep; 25(9):1054–60.
- Correlation between phylogroups and intracellular proteomes of *Propionibacterium acnes* and differences in the protein expression profiles between anaerobically and aerobically grown cells

Referencias

- Cebrián R, Arévalo S, Arias-Santiago S, Riazco C, Rojo MD, Bermúdez P, *et. al* Optimization of genotypic and biochemical methods to profile *P. acnes* isolates from a patient population. *J Microbiol Methods*. 2017; 141:17–24.
- Paugam C, Corvec S, Saint-Jean M, Le Moigne M, Khammari A, Boisrobert A, *et al*. *Propionibacterium acnes* phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.14206>
- Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. *Appl Environ Microbiol*. 1979; 38(4):585–9.
- Nagy E, Urbán E, Becker S, Kostrzewa M, Vörös A, Hunyadkürti J, *et al*. MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe*. 2013; 20:20–6.
- Collier CN, Harper JC, Cafardi JA, Cantrell WC, Wang W, Foster KW, *et al*. The prevalence of acne in adults 20 years and older. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Jan; 58(1):56–9.
- Kaminsky A, Florez-White M, Arias MI, Bagatin E. Clasificación del acné: Consenso Ibero-Latinoamericano, 2014. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 2015; 43(1):18–23.